

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



# **Otimização e Implementação de Novas Metodologias de Diagnóstico Microbiológico para a Produção de Vacinas de Rebanho**

**Mestrado em Bioquímica**  
Especialização em Bioquímica

Ricardo José Laranjeira Rodrigues

Dissertação orientada por:  
Doutora Margarida Meireles  
Dra. Nélia Fernandes

2015





## **Agradecimentos**

À Doutora Margarida Meireles, minha orientadora, pela simpatia e prestabilidade, pelo acompanhamento e preocupação com o decorrer do trabalho e, acima de tudo, pelo espírito crítico e objetivo que tanto me ajudou na concretização desta dissertação.

Um agradecimento muito especial à Dra. Nélia Fernandes, coorientadora, colega de trabalho e ouvinte, pela forma como me recebeu no LPVR, por tudo o que me ensinou e pela preocupação constante com o meu desempenho e resultados. Por nunca me deixar desistir e, acima de tudo, pela confiança que depositou em mim durante os 13 meses de estágio, agradeço-lhe muito.

Às colegas de equipa do LPVR, Sandra Fernandes, Inês Canelhas e Sara Cabaço, pela fácil integração, espírito de cooperação e camaradagem, prestabilidade, constante boa disposição e por me fazerem crescer a vários níveis enquanto profissional e enquanto pessoa.

À Medinfar-Sorológico, personificada na Equipa do LPVR, um Muito Obrigado por esta oportunidade.

À minha mãe, ao meu pai e ao meu irmão, por todos os esforços e preocupação constantes. Por tudo.

A toda a minha família, pelo apoio incondicional e preocupação durante estes dois anos turbulentos.

A todos aqueles que cruzaram a minha vida nestes dois anos, uns mais perto outros mais longe, sem discriminar ninguém, pela ajuda, preocupação e por tudo o que aprendemos uns com os outros.

## Resumo

O correto isolamento de estirpes para posterior produção de Vacinas de Rebanho determina a qualidade e eficácia deste produto. O isolamento de espécies com crescimento fastidioso apresenta-se muitas vezes como difícil e moroso, tendo os meios de cultura um papel fundamental no processo.

A rapidez com que uma análise microbiológica se efetua é fundamental para que se possa administrar a Vacina de Rebanho aos animais em tempo útil. Apesar de o LPVR ter procedimentos eficazes bem estabelecidos na sua rotina, foram estabelecidas metodologias alternativas para o processamento de zaragatoas e amostras de leite que permitiram que a análise fosse efetuada mais rapidamente, com igual qualidade e obtendo-se os mesmos resultados.

Para estirpes causadoras de Pododermatite, o meio Schaedler Agar apresentou-se como o mais eficaz para isolamento e manutenção de culturas, sendo então a primeira escolha para estas situações. Já as estirpes de *Brachyspira hyodysenteriae* das amostras recebidas não apresentaram qualquer crescimento nos meios propostos por Calderaro (2005), não tendo sido por isso possível chegar ao isolamento destas e produzir uma Vacina de Rebanho para a Disenteria Suína.

Toda a produção passa por controlos ao nível do processo em si, mas também das condições e equipamentos em que decorre. Foi elaborado e validado um protocolo que permitisse comprovar a aplicabilidade de um teste para comprovação do estado de esterilidade do produto final. A mudança de instalações implica o estabelecimento de novos procedimentos de limpeza dos laboratórios e dos equipamentos, tendo sido elaborado um novo protocolo e respetiva validação para estes.

Palavras-chave:

isolamento ; pododermatite ; disenteria ; otimização ; validação

## Abstract

The correct isolation of bacterial strains for the production of herd vaccines is one of the most important steps to get a product with quality and efficacy. The isolation of species with a fastidious growing is difficult and it takes a lot of time. Culture mediums have a fundamental role in this process.

The fastness of the analysis is fundamental so we can administrate a timely vaccine to the animals. Although the Laboratory has its own procedures, effective and established, we could improve them by implementing new methods to process swabs and milk samples. Thus, the analysis was made more quickly with the same quality and results.

To footrot etiological agents, Schaedler Agar has been the most effective medium to isolate and maintain the bacterial cultures, being the first choice for those situations.

*Brachyspira hyodysenteriae* strains from our biological samples did not grow on Calderaro's (2005) mediums, not allowing them isolation and the production of a Herd Vaccine.

The whole production process is controlled itself but also the conditions and equipment where it happens. It was developed and validated a protocol that would allow proving the applicability of a test for proof the sterility state of the final product. A facility change implies the establishment of new cleaning procedures to the labs and equipment, being developed a new protocol and respective validation.

Keywords:

isolation ; footrot ; dysentery ; optimization ; validation

# Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. A problemática do tratamento com antibióticos.....	1
1.1.1. Resistência a antibióticos.....	1
1.1.2. Permanência de antibióticos.....	1
1.2. Vacinas de Rebanho.....	2
1.2.1. Princípios e Produção.....	2
1.2.2. Controlos Laboratoriais.....	3
1.2.3. Eficácia e Vantagens das Vacinas de Rebanho e Autovacinas.....	3
1.2.4. Enquadramento legal.....	4
1.2.5. Esterilidade do Produto Final.....	5
1.3. Amostras biológicas: recolha, processamento e isolamento de estirpes.....	5
1.4. Caracterização das doenças.....	6
1.4.1. Queratoconjuntivite infecciosa.....	6
1.4.2. Colibaciloses e Enterotoxémias.....	6
1.4.3. Mastites.....	7
1.4.4. Pododermatite.....	8
1.4.5. Disenteria suína.....	10
1.5. Objetivos.....	11
<b>2. Material e métodos.....</b>	<b>15</b>
2.1. Procedimentos de Rotina.....	15
2.1.1. Meios de cultura.....	15

2.1.2. Colheita de material biológico.....	15
2.1.3. Processamento de amostras e incubação.....	16
2.1.4. Coloração de Gram.....	16
2.2. Otimização de Protocolos de Processamento (I).....	16
2.2.1. Processamento de Zaragatoas oculares e retais (IA).....	16
2.2.2. Processamento de Leites (IB).....	17
2.3. Implementação de novas Metodologias de diagnóstico (II).....	18
2.3.1. Isolamento de estirpes causadoras de Pododermatite (IIA).....	18
2.3.2. Isolamento de <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> (IIB).....	19
2.4. Elaboração e Validação de Protocolos (III).....	19
2.4.1. Limpeza e desinfecção salas e equipamentos (IIIA).....	19
2.4.1.1. Amostragem automática de ar.....	19
2.4.1.2. Amostragem de ar por placas de exposição.....	19
2.4.1.3. Amostragem de superfícies.....	19
2.4.1.4. Tratamento e análise de dados.....	20
2.4.2. Ensaio de esterilidade do Produto Acabado (IIIB).....	20
2.4.2.1. Sementeiras e incubação.....	20
2.4.2.2. Leitura de resultados.....	22
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>25</b>
3.1. Otimização de protocolos de processamento (I).....	25
3.1.1. Processamento de Zaragatoas oculares e retais (IA).....	25
3.1.2. Processamento de Leites (IB).....	32
3.2. Implementação de novas Metodologias de diagnóstico (II).....	37
3.2.1. Isolamento de estirpes causadoras de Pododermatite (IIA).....	37
3.2.2. Isolamento de <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> (IIB).....	42

3.3. Elaboração e Validação de Protocolos (III).....	44
3.3.1. Limpeza e desinfecção de Salas e Equipamentos (IIIA).....	44
3.3.2. Ensaio de esterilidade do Produto Acabado (IIIB).....	50
<b>4. Conclusão e Perspetivas Futuras.....</b>	<b>53</b>
<b>5. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>57</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>63</b>

## Índice de Figuras

Fig.1 – Representação esquemática dos objetivos do trabalho.....	13
Fig.2a – Placa de AS resultante da sementeira de 100µl de leite.....	32
Fig.2b - Placa de Mck resultante da sementeira de 100µl de leite.....	33
Fig.3a - Placa de AS resultante da sementeira de 10µl de leite.....	33
Fig.3b - Placa de Mck resultante da sementeira de 10µl de leite.....	33
Fig.4 - Perfil Bioquímico da Colónia 1: <i>Fusobacterium necrophorum</i> .....	41
Fig.5 - Perfil Bioquímico da Colónia 2: <i>Prevotella melaninogenica</i> .....	42
Fig.6 - Perfil Bioquímico da Colónia 3: <i>Bacteroides</i> sp.....	42

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Estirpes de referência e respetivas condições de incubação, para teste de promoção de crescimento.....	22
Tabela 2 – Isolados das Zaragatoas oculares, metodologia utilizada e duração da análise, em dias.....	26
Tabela 3 - Isolados das Zaragatoas retais, metodologia utilizada e duração da análise, em dias.....	28
Tabela 4 – Espécies bacterianas isoladas das amostras de leite, segundo as Metodologias A e B.....	34
Tabela 5 – Colónias isoladas, segundo zaragatoa, meio de crescimento e coloração de Gram.....	39
Tabela 6 – Aspeto geral dos 3 tipos de colónias isoladas.....	41
Tabela 7 – Registo da amostragem de superfícies nas CFL/TFL durante as 8 semanas.....	49
Tabela 8 – Resultados da validação do Ensaio de esterilidade.....	50
Tabela 9 – Resultados da validação do Ensaio de esterilidade, com adição de Tween 80.....	52



## Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Representação da duração das análises às zaragatoas oculares, pelas Metodologias A e B.....	27
Gráfico 2 - Representação da duração das análises às zaragatoas retais, pelas Metodologias A e B.....	29
Gráfico 3 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Cult. Ativas.....	44
Gráfico 4 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Cult. Inativas.....	44
Gráfico 5 – Registos da amostragem automática de ar na antecâmara do Lab. de Formulação e Enchimento.....	45
Gráfico 6 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Formulação e Enchimento.....	45
Gráfico 7 – Registos da amostragem automática de ar no corredor de aceso ao Lab. de Cult. Inativas e Lab. de Formulação e Enchimento.....	46
Gráfico 8 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Cult. Inativas.....	46
Gráfico 9 – Registos da amostragem automática de ar na Sala de Pesagens e Preparação de Meios.....	47
Gráfico 10 – Registos da amostragem automática de ar na Sala de Distribuição de Meios Estéreis.....	47

Gráfico 11 – Registos da amostragem automática de ar no Corredor de Acesso às salas de apoio.....	47
Gráfico 12 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Controlo de Qualidade do Produto Acabado.....	48
Gráfico 13 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Microbiologia.....	48
Gráfico 14 – Duração total das análises a zaragatoas, segundo as metodologias A e B.....	53

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

**LPVR** – Laboratório Produtor de Vacinas de Rebanho

**CFL** – Câmara de Fluxo Laminar

**TFL** – Tenda de Fluxo Laminar

**(b-)** – bacilo Gram negativo

**(cb-)** – bacilo cocóide/cocobacilo Gram negativo

**PCR** – Polymerase Chain Reaction

**AS** – Meio de Cultura sólido Agar Sangue

**Mck** – Meio de Cultura sólido Agar MacConkey

**Sch** – Meio de Cultura sólido Agar Schaedler

**SchKV** – Meio de Cultura sólido Agar Schaedler tratado com Kanamicina e Vancomicina

**TSA** – Meio de Cultura sólido Tryptic Soy Agar

**TSB** – Meio de Cultura líquido Tryptic Soy Broth

**ufc** – Unidade Formadora de Colônia

**ZO** – Zaragatoa Ocular

**ZR** – Zaragatoa Retal

# **1. Introdução**

## **1.1. A problemática do tratamento com antibióticos**

Nas últimas décadas, assuntos como o uso excessivo de antibióticos em animais de alimentação, têm ganho o interesse por parte da comunidade científica e são já vistos como problemas, não só por parte dos médicos veterinários, como também pelos próprios produtores e explorações pecuárias.<sup>1</sup>

### **1.1.1. Resistência a antibióticos**

O uso excessivo de antibióticos tem sido altamente discutido, dado o consecutivo aumento da ocorrência de estirpes bacterianas resistentes aos antibióticos, uma vez que o uso deste tipo de substâncias cria uma pressão seletiva a favor dos organismos resistentes.<sup>10</sup>

A falta de controlo no uso destes fármacos não só em veterinária, mas também na medicina humana e na agricultura, contribui para o constante aparecimento de bactérias não-sensíveis aos tratamentos, o que não é acompanhado de forma rentável pelo aumento de antibióticos alternativos a estes primeiros.<sup>11</sup>

### **1.1.2. Permanência de antibióticos**

Outra questão pertinente é a da permanência dos antibióticos no organismo do animal tratado (intervalo de segurança) e os resíduos que ainda persistem nos produtos da cadeia alimentar humana.

Lederer (1991) relatou que, após a injeção de antibióticos em vacas se constatou que estes estavam presentes no leite ordenhado dos animais durante 30-78h após a injeção, não sendo aconselhado consumir o leite das primeiras 96h após a administração. No caso da penicilina G, esta foi detetada nos 10 dias seguintes, o que levaria a perdas económicas de

grandes dimensões quando nos referimos a explorações leiteiras com um elevado número de animais.<sup>15</sup>

A principal forma de evitar o uso recorrente das terapias por antibióticos é o uso de normas preventivas planeadas e devidamente controladas, tais como implementação de melhores condições de manejo e uso de vacinas.<sup>1</sup>

## **1.2. Vacinas de Rebanho**

### **1.2.1. Princípios e Produção**

A vacinação é definida como a injeção de uma suspensão de microrganismos integrais mortos ou atenuados, ou partes destes, com o objetivo de criar, no organismo alvo, imunidade contra essas mesmas espécies de microrganismos ou suas toxinas.<sup>13</sup>

Vacinas de rebanho são vacinas produzidas através de estirpes bacterianas isoladas a partir de amostras biológicas de um ou mais animais de um dado rebanho, e que têm o objetivo de ser administradas aos animais desse mesmo rebanho. No caso de a amostra ser colhida num animal e a vacina se administrar a esse mesmo animal, dá-se-lhe o nome de autovacina.

O processo de produção desde a análise microbiológica até ao controlo de qualidade, tem uma duração de cerca de 4 semanas. A produção da vacina propriamente dita começa com o cultivo em meio líquido rico de cada uma das estirpes selecionadas para compor a vacina.

O volume a perfazer para cada cultura depende sempre do número de doses a produzir, de forma a que, no produto final, possamos ter a concentração celular adequada para provocar uma resposta imunológica nos animais aos quais se administra a vacina.

As culturas, depois de perfeitas para os volumes indicados, são inativadas e a parte celular da cultura é utilizada para a formulação da vacina (constituindo o seu princípio ativo), em conjunto com o conservante, o adjuvante e o excipiente.

O processo de Controlo de qualidade consiste numa série de 5 testes distintos que nos permitem comprovar a qualidade do produto final,

verificando assim se os valores obtidos se encontram dentro das especificações aprovadas/exigidas pelas Farmacopeias e Guidelines Internacionais.

### **1.2.2. Controlos Laboratoriais**

Todo o processo de produção é acompanhado por um vasto conjunto de testes de controlo quer do processo de produção propriamente dito, quer das condições dos laboratórios e dos equipamentos intervenientes na mesma.

Um dos aspetos principais é a avaliação microbiológica da qualidade do ar dos laboratórios e equipamentos onde o produto é exposto diretamente. É importante para se garantir a qualidade do produto, que não haja qualquer tipo de contaminação microbiológica externa ao produto. A eficácia e fiabilidade do produto final pode ficar comprometido se não garantirmos as condições de assepsia nas câmaras e tenda de fluxo laminar (CFL e TFL, respetivamente) e o controlo do número de microrganismos viáveis no ar dos laboratórios.

### **1.2.3. Eficácia e Vantagens das Vacinas de Rebanho e Autovacinas**

Em resposta à vacinação, o animal desenvolve anticorpos específicos contra as estirpes bacterianas isoladas no rebanho.

Há um conjunto de vantagens associadas às vacinas de rebanho/autovacinas que as tornam muito atrativas, nomeadamente porque se tratam de vacinas à partida mais eficazes. A eficácia está relacionada com a sua especificidade. As estirpes que compõem a vacina foram isoladas no rebanho no qual esta vai ser aplicada, o que não se verifica com as vacinas comerciais que atuam muitas vezes por reações cruzadas.

Estas vacinas têm uma ação preventiva e profilática e parecem ser a melhor solução face a todas as problemáticas associadas aos antibióticos.

Além disso, no caso de surgirem novas patologias associadas a bactérias, este tipo de vacinas será com certeza mais apta a responder a esse tipo de

problemas, uma vez que as vacinas comerciais ou qualquer outro novo fármaco que seja desenvolvido, demorará anos a ficar disponível.

As vacinas de rebanho são ainda economicamente mais vantajosas, isto porque, numa só, poder conter bactérias associadas a diversas patologias, conferindo proteção múltipla aos animais e reduzindo a necessidade de comprar e administrar diferentes vacinas para as várias patologias. A redução do número de vacinas a aplicar vai reduzir o stress associado às injeções nos animais e levar ao aumento das taxas de produção. As vacinas de rebanho, são também mais baratas do que a terapia por antibióticos ou quando comparadas com muitas vacinas comerciais que confirmam imunidade a um variado conjunto de patologias.

#### **1.2.4. Enquadramento legal**

Até ao final do ano 2008 havia ausência de legislação no que diz respeito à produção de vacinas de rebanho e autovacinas. Até esta altura, havia produção em duas instituições públicas, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (ex-FMV-UTL) e Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (ex-LNIV) e dois Laboratórios privados.

Atualmente, apenas o Laboratório Produtor de Vacinas de Rebanho (LPVR) da Medinfar – Sorológico, S.A. se encontra autorizado a produzir e comercializar Vacinas de Rebanho e Autovacinas em Portugal.

A legislação atual refere que só se podem usar vacinas de rebanho quando não existem vacinas comerciais para a patologia em questão ou, caso existam, não se tenham mostrado eficazes. Também não está autorizada a produção de vacinas com vírus.

À semelhança de qualquer medicamento, a prescrição de uma vacina de rebanho terá de ser feita por um médico veterinário com a devida vinheta médica. É obrigatório realizar um ensaio de segurança com dose dupla em dois animais da exploração, só se aplicando a restante vacina se não se observarem reações adversas.

### **1.2.5. Esterilidade do Produto Final**

A certeza de que as Vacinas de Rebanho não foram alvo de contaminação microbiológico durante as últimas etapas do processo de fabrico é uma das principais garantias de que o produto final é de qualidade e de que, aquando da sua administração aos animais, não vai causar reações adversas ou provocar doença por parte dos agente contaminantes.

O ensaio de esterilidade aplicado ao produto final (Vacinas de Rebanho), por não se encontrar totalmente em concordância com o descrito na Farmacopeia Europeia, carece de validação.

De modo a preencher todos os requisitos necessários, descritos na Farmacopeia em vigor, foi elaborado um protocolo para que o teste seja validado e a procedimento posto em vigor no LPVR.

### **1.3. Amostras biológicas: recolha, processamento e isolamento de estirpes**

No contexto da produção e eficácia das vacinas de rebanho, o correto isolamento e identificação das estirpes presentes nas amostras biológicas é um dos principais fatores de sucesso no tratamento e prevenção das patologias. Só boas amostras resultarão em boas vacinas.

Antes da colheita das amostras biológicas, deve ser feita uma avaliação aos animais doentes de forma a que as amostras colhidas sejam as mais indicadas e passíveis de conter o agente patogénico responsável. As amostras devem ainda ser transportadas e processadas o mais rapidamente possível.<sup>17,18</sup>

Tendo em conta as suspeitas dos médicos veterinários, as amostras são processadas em meios agarosos ricos e apropriados e incubados sob determinadas condições, de forma a possibilitar o crescimento das estirpes bacterianas responsáveis pela patologia suspeita. As colónias obtidas são



isoladas, analisadas individualmente e identificadas com base em testes bioquímicos variados.

As estirpes identificadas são então criopreservadas até que haja indicação médica para produção de uma vacina.

## **1.4. Caracterização das doenças**

### **1.4.1. Queratoconjuntivite infecciosa**

A Queratoconjuntivite Infecciosa que afeta os ruminantes, principalmente os bovinos, é uma doença caracterizada por manifestações clínicas que vão desde a conjuntivite até à ulceração e formação de abscessos na córnea, levando muitas vezes à cegueira.

A principal consequência é a não alimentação devido à cegueira e consequente incapacidade de alcançar alimentos, com grande impacto económico, nomeadamente na perda de peso (animais de carne) e/ou diminuição na produção de leite (animais de leite).

A bactéria *Moraxella bovis* foi identificada como sendo o principal agente causador desta patologia há já várias décadas, mas o seu tratamento continua a ser difícil, passando por injeções com antibióticos na conjuntiva do animal durante vários dias. Segundo pesquisas recentes, a forma mais eficiente é a administração de vacinas de rebanho, com capacidades preventivas e profiláticas, uma vez que as vacinas comerciais e os antibióticos apresentam resultados pouco eficazes contra as estirpes de *M.bovis* que afetam grande parte dos rebanhos.<sup>2</sup>

### **1.4.2. Colibaciloses e Enterotoxémias**

A colibacilose é uma doença entérica e/ou septicémica causada por uma enterobactéria, que causa elevada mortalidade.

O agente etiológico é o bacilo Gram negativo *Escherichia coli*, que possui mais de 150 estirpes conhecidas, comuns em várias espécies animais, incluindo o homem.<sup>32</sup>

A persistência desta doença causa elevados prejuízos económicos dados os elevados custos do tratamento e as elevadas taxas de mortalidade.

A *E.coli* penetra no organismo dos animais suscetíveis pela mucosa oral e/ou nasofaringe e vai-se instalar na mucosa intestinal.

São várias as formas de colibacilose, segundo a estirpe de *E.coli* envolvida.

No caso da colibacilose entérica, a *E.coli* prolifera intensamente no intestino, alcançando concentrações muito elevadas e causa diarreia.

Na colibacilose septicémica, a bactéria invade o organismo também por via oral e pela nasofaringe, chegando diretamente ao intestino. Atinge rapidamente a circulação sanguínea e distribui-se por quase todos os órgãos, principalmente os rins.<sup>32</sup>

A Enterotoxémia é causada por estirpes de *Clostridium perfringens*. É uma doença muitas vezes fatal e que se encontra espalhada por todo o mundo.

O agente *Clostridium perfringens* provoca doenças entéricas num grande número de espécies, incluindo os ruminantes, aves e humanos. Estão identificados cinco tipos de *C. perfringens* com base nas toxinas produzidas.

O principal agente envolvido na enterotoxémia caprina é o *C.perfringens* tipo D. Esta bactéria anaerobia produtora de toxinas, é um habitante do trato digestivo dos ruminantes, geralmente em pequeno número. Em condições favoráveis, a proliferação desta bactéria, associada à libertação de toxinas é a responsável pelos problemas no hospedeiro, que podem conduzir à sua morte.<sup>31</sup>

### **1.4.3. Mastites**

As mastites são uma inflamações da glândula mamária que podem ter origem infecciosa, traumática ou tóxica.

É um problema frequente em vacas leiteiras e é reconhecida como uma das doenças com maior impacto na produtividade das explorações de leite.

Se não for tratada, tem normalmente consequências ao nível da redução da quantidade e também qualidade do leite produzido e conduz a uma perda de

bem-estar pelo animal, o que leva em situações extremas à morte dos afetados.

A etiologia a nível microbiológico é muito variável. As inflamações podem dever-se a enterobactérias (como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*), espécies variadas de *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativos*.<sup>33</sup>

*Streptococcus agalactiae* é altamente contagioso e é um parasita obrigatório na glândula mamária.

Este continua a ser uma das maiores causas de mastites subclínicas em vacas de leite, sendo responsável por grandes perdas económicas neste tipo de explorações.<sup>34</sup>

#### **1.4.4.Pododermatite**

A Pododermatite é uma patologia associada aos cascos dos ruminantes, que comporta anualmente custos bastante elevados. Muitas explorações pecuárias gastam tempo e dinheiro inúmeras vezes para tratar os seus animais e evitar reincidências deste problema.

A pododermatite, conhecida vulgarmente em Portugal por peeira nos pequenos ruminantes, é uma doença que pode ser prevenida, desde que haja um processo de manutenção atento e ativo dos animais ao longo de todo o ano.<sup>19</sup>

Trata-se de uma infeção do tecido interdigital, que resulta numa incapacidade de o animal se manter de pé. Os animais afetados arrastam-se frequentemente e por longos períodos, o que resulta em perdas de peso e de produção de leite, com consequente perda de valor comercial destes.<sup>19</sup>

Em casos mais extremos, os animais chegam a pastar ajoelhados, não havendo muitas vezes uma alimentação adequada e, no caso dos machos, por estarem imóveis, não há capacidade de reprodução.

Por ser uma doença infecciosa, é de fácil transmissão e um caso num rebanho é suscetível de contaminar todos os outros animais.

A prevenção passa essencialmente pelos cuidados com os animais. A vacinação com injetáveis comerciais é um grande aliado das explorações

embora, muitas das vezes, não seja eficaz contra todas as estirpes que os afetam. As vacinas comercializadas em Portugal contêm apenas estirpes variadas de uma espécie, não conferindo por isso proteção contra infeções possíveis por outros agentes.

O tratamento baseia-se essencialmente na sanitização dos cascos dos animais, acrescida do uso de antibióticos combinados, efetivos contra vários agentes patogénicos.

O chamado pedilúvio é o método mais usado, por ser o mais fácil e menos dispendioso. Trata-se de um banho químico desinfetante das extremidades dos membros dos animais, de forma a promover a morte das bactérias e evitar a disseminação destas pelos campos de pastagem. A combinação de químicos usados varia significativamente com a gravidade das infeções e do número de animais afetados, passando por dissoluções de formol em água, até soluções de sulfato de cobre.

Este tipo de tratamento acaba por não ser realmente efetivo uma vez que, no caso de as pastagens estarem já infetadas com algum dos agentes, a patologia se poder reiniciar dentro de algum tempo.

O agente mais comum é a bactéria *Fusobacterium necrophorum*. No entanto, está descrito que é uma patologia causada pela ação sinérgica de variadas estirpes bacterianas, com incidências variadas.

Um estudo etiológico espanhol da Universidade da Extremadura, em Cáceres, revelou que as espécies mais frequentemente isoladas de casos recorrentes de Pododermatite eram *Fusobacterium necrophorum* (40%), *Bacteroides nodosus* (31,7%), *Porphyromonas assacharolytica* (21,1%) e *Prevotella melaninogenica* (12,9%), todas estas estritamente anaeróbias.<sup>21</sup>

As bactérias associadas a esta patologia atuam de forma simbiótica. *F.necrophorum* é normalmente o agente primário, que entra em possíveis cortes na pele dos animais. Depois, os outros agentes entram e acabam por perpetuar a infeção. As bactérias multiplicam-se e destroem o tecido, o que acaba por criar condições anaeróbias com a morte do tecido, o que favorece ainda mais o seu alastramento.

*F.necrophorum* é um bacilo gram-negativo (b-) estritamente anaeóbio, não formador de esporos, habitualmente visto microscopicamente como um emaranhado de bacilos filamentosos. Naturalmente, coloniza o sistema

digestivo de herbívoros, por isso, é frequentemente encontrado ambientalmente, para onde vai por meio de fezes.<sup>22</sup>

Patogenicamente é de elevada importância, estando envolvido em abscessos hepáticos, necrobaciloses digitais em ruminantes e metrites, bem como outras doenças que levam a estados de morbidez.

*B.nodosus* é visto como o principal agente causador da pododermatite, uma vez que é este que induz a formação das lesões e sendo um agente estritamente anaeróbico e de crescimento fastidioso, o seu isolamento é muito complicado, a partir de amostras biológicas.<sup>23</sup>

*P.melaninogenica* e *P.assacharolytica* são duas espécies de bacilos cocóides Gram-negativos (cb-), estritamente anaeróbios e também de difícil isolamento. Por serem também colonizadores naturais do trato intestinal de vários animais pecuários, são suscetíveis de serem encontrados nas pastagens e locais de criação de gado.

#### **1.4.5. Disenteria suína**

A disenteria suína é uma doença intestinal severa que envolve diarreias muco-hemorrágicas em suínos em estádios finais de crescimento e que levam a grandes perdas económicas devido à mortalidade, diminuição da taxa de crescimento dos animais, alimentação ineficiente e elevados custos com os tratamentos.<sup>27</sup>

As espiroquetas são há tempo conhecidas como colonizadoras intestinais de vários animais. A *Brachyspira hyodysenteriae* é uma espiroqueta patogénica de crescimento bastante fastidioso e é conhecida já como o agente etiológico da disenteria suína. É uma bactéria com metabolismo anaeróbico e de crescimento lento que requer meios e condições de crescimento exigentes, sendo por isso de isolamento difícil. As rotinas de diagnóstico laboratorial passam normalmente pela sua cultura em meios seletivos tratados com antibióticos, para que haja uma taxa de crescimento favorável para as espiroquetas e uma diminuição do crescimento das outras espécies bacterianas normalmente encontradas nas fezes dos animais.<sup>25</sup> Traços fenotípicos característicos da *B.hyodysenteriae* como a hemólise completa, produção de indol e crescimento típico em *swarming* possibilitam uma

identificação presuntiva da espécie em meios agarosos. A identificação absoluta é normalmente efetuada por recurso a Polymerase Chain Reactions (PCR) específicas para esta espécie.

## **1.5. Objetivos**

O Laboratório Produtor de Vacinas de Rebanho possui, desde que iniciou a sua atividade, protocolos científicos que asseguram a realização das análises microbiológicas segundo princípios e metodologias testadas e permitem um correto diagnóstico microbiológico das patologias.

Alguns destes procedimentos têm, no entanto, associados alguns passos demorados que tornam necessários cerca de sete dias até que a análise seja terminada e todas as estirpes identificadas. Um dos objetivos foi, então, encontrar procedimentos alternativos que mantivessem a fiabilidade dos métodos e resultados mas que permitissem que a análise fosse facilitada em termos de processos e tempo.

Algumas patologias, nomeadamente a Pododermatite nos ruminantes e a Disenteria nos suínos, têm a ela associados microrganismos de crescimento fastidioso e difícil isolamento e identificação e, por isso, não tinham até então um protocolo de análise viável. Com este trabalho pretendeu-se também colmatar essas limitações, descrevendo métodos analíticos e de identificação que permitissem que esta patologia pudesse também ser alvo de uma análise eficaz e a consequente produção da Vacina de Rebanho para a patologia fosse possível em tempo útil.

Todos os procedimentos em vigor no LPVR são alvo de controlos variados. As condições dos novos laboratórios careciam de validação, que permitisse afirmar que o produtos intermédio e final não estavam em risco de que a sua qualidade fosse posta em causa devido a condições defeituosas de limpeza e desinfeção das salas e equipamentos. Assim, foi também tido como objetivo a elaboração um protocolo que permitisse controlar a qualidade do ar.

Para além dos controlos em processo, o controlo de qualidade do Produto Final tem de ser exaustivo e os ensaios usados validados. O ensaio de esterilidade do produto é um dos ensaios realizados e carecia de validação.

O último objetivo deste trabalho foi a elaboração do Protocolo de Validação do Teste de esterilidade ao Produto final e respetiva execução.

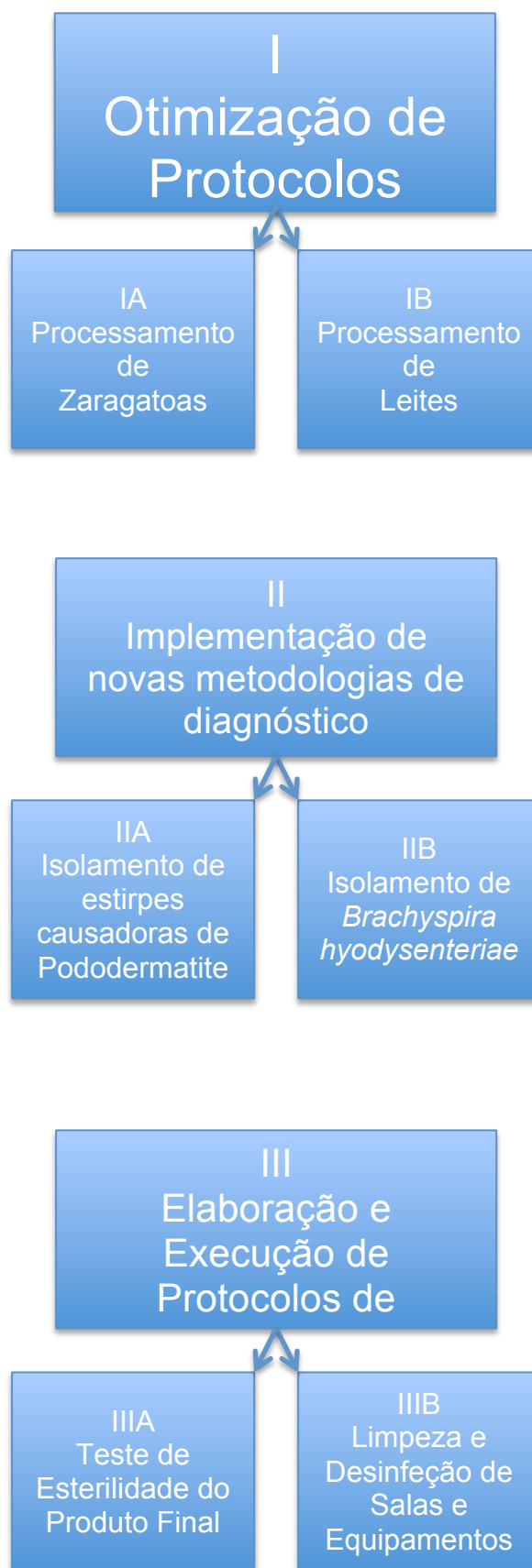


Fig.1 – Representação esquemática dos objetivos do trabalho



## **2. Material e métodos**

### **2.1. Procedimentos de Rotina:**

#### **2.1.1. Meios de cultura**

Os meios de cultura Agar Sangue (AS) e Schaedler (Sch) + Schaedler Kanamicina e Vancomicina (SchKV), bem como as placas de contacto para amostragem de superfícies, chegam ao Laboratório já preparados e distribuídos em placas de Petri estéreis através da Biomereux e Oxoid, respetivamente.

Todos os outros meios de cultura como Agar MacConkey (Mck), Tryptic Soy Agar (TSA), Saboraud Dextrose Agar (SDA) e meios agarosos seletivos/diferenciais para identificação são comprados desidratados e preparados segundo indicação dos fornecedores, desde a dissolução em água purificada até à esterilização em autoclave. Depois de preparados, são distribuídos em placas de Petri estéreis, em câmara de fluxo laminar, por um Profissional qualificado do LPVR.

Os meios de cultura líquidos como Tryptic Soy Broth (TSB), utilizados foram preparados com água purificada segundo indicação dos fornecedores e autoclavados durante 20min a 121°C.

#### **2.1.2. Colheita de material biológico**

Todo o material biológico destinado a análise laboratorial foi colhido em explorações pecuárias portuguesas, utilizando material estéril descartável e foi feito por um profissional qualificado, segundo as normas em vigor no LPVR.

As amostras foram imediatamente refrigeradas e transportadas nestas condições até ao Laboratório de Microbiologia do LPVR, armazenadas no frigorífico e processadas nesse mesmo dia.

### **2.1.3. Processamento de amostras e incubação**

O processamento das amostras biológicas foi feito segundo protocolo em vigor no LPVR, sob condições totais de assepsia, em Câmara de Fluxo Laminar, utilizando apenas material estéril descartável. A incubação das placas semeadas foi feita em estufas térmicas a temperaturas ideais de crescimento para as espécies alvo, sob condições de aerobiose ou anaerobiose, consoante a amostra e o agente etiológico que se pretendia isolar.

### **2.1.4. Coloração de Gram**

A coloração de Gram foi realizada de acordo com os princípios descritos por Hans Gram em 1884.

Para cada análise foi efetuado um esfregaço bacteriano fino numa lâmina de vidro. As lâminas foram submersas sucessivamente em Violeta de Cristal, Soluta de Lugol, solução descolorante e Solução de Safranina, com lavagens sucessivas entre cada submersão.

Já coradas, as lâminas foram secas e observadas ao microscópico ótico.

## **2.2. Otimização de Protocolos de Processamento (I)**

### **2.2.1. Processamento de Zaragatoas oculares e retais (IA)**

Foram recebidas 15 zaragatoas provenientes de diversas localizações geográficas nacionais, contendo material biológico referente a patologias variadas.

Cada uma das zaragatoas foi identificada com numeração sequencial (1-15) e processada segundo metodologia em vigor no LPVR (Metodologia A): esfregaço direto da zaragatoa em placa de Petri com meio generalista rico (AS); e segundo uma metodologia alternativa (Metodologia B): diluição da zaragatoa em 10 ml de água peptonada e posterior diluição desta solução a

10<sup>-2</sup>. Da diluição final foram semeados 0,1ml também em placa de Petri com meio generalista rico (AS).

As 30 placas foram devidamente identificadas com o número da zaragatoa correspondente e segundo a metodologia utilizada (A ou B) e incubadas a 37°C *overnight* em aerobiose, de forma a possibilitar o crescimento e desenvolvimento das colónias bacterianas.

Depois disto, todas as placas foram analisadas individualmente, macroscopicamente, e, em cada placa, foram selecionadas todas as colónias com morfologias distintas, depois isoladas em novas placas do mesmo meio. Cada colónia isolada foi sujeita a coloração de Gram, observada ao microscópio e, consoante o resultado, testes bioquímicos e plaqueamento em meios seletivos e/ou diferenciais, de forma a possibilitar a identificação presuntiva de cada estirpe, segundo procedimento em vigor no LPVR.

### **2.2.2. Processamento de Leites (IB)**

Foram recebidos 23 leites provenientes de vacas e pequenos ruminantes de várias regiões de Portugal. As amostras foram identificadas com numeração sequencial (1-23).

O processamento de todas as amostras foi feito segundo dois protocolos diferentes:

A (em vigor no LPVR) - Homogeneizar o leite por agitação; semear 100µl da amostra em placa de Petri com meio AS e distribuí-lo pelo agar com espalhador em L estéril; repetir o procedimento em placa de Petri com agar MacConkey (Mck).

B – Homogeneizar o leite por agitação; semear um loop de ança de 10µl da amostra no centro de uma placa de Petri com meio AS e distribuí-lo pelo agar com uma ança estéril nova, fazendo um movimento ascendente. Ir rodando a placa 45° de cada vez e repetir o movimento ascendente com a ança; repetir o procedimento em placa de Petri com Mck.

A incubação de todas as placas (devidamente identificadas com número da amostra e metodologia de processamento utilizada) foi feita a 37°C,

*overnight*, sob condições de aerobiose, de forma a possibilitar o crescimento e desenvolvimento das colónias bacterianas.

Depois disto, todas as placas foram analisadas individualmente, macroscopicamente, e, em cada placa, foram selecionadas todas as colónias com morfologias distintas, que foram isoladas em novas placas do mesmo meio.

Cada colónia isolada foi sujeita a coloração de Gram, observada ao microscópio e, consoante o resultado, testes bioquímicos e plaqueamento em meios seletivos e/ou diferenciais, de forma a possibilitar a identificação presuntiva de cada estirpe, segundo procedimento em vigor no LPVR.

## **2.3. Implementação de novas Metodologias de diagnóstico (II)**

### **2.3.1. Isolamento de estirpes causadoras de Pododermatite (IIA)**

Foram selecionados 18 ovinos pertencentes a uma exploração pecuária portuguesa. As amostras biológicas foram colhidas através de zaragatoas de carvão ativado (DeltaLab) por raspagem interdigital e transportadas para o Laboratório no próprio dia, devidamente refrigeradas.

Todas as zaragatoas foram semeadas em 3 meios de agar rico: 1 placa Agar Sangue Biomerieux, 1 placa bipartida de Schaedler Agar e Schaedler agar tratado com Kanamicina e Vancomicina, Oxoid.

Todas as placas foram incubadas a 37°C, sob condições de anaerobiose, durante 72h.

Após a incubação, foram observados os crescimentos, foi feita coloração de Gram a uma pequena amostra de cada uma das placas e foi feita a observação microscópica.

As 36 placas foram analisadas individualmente e, em cada uma, foram isoladas todas as colónias macroscopicamente distintas para o mesmo meio de agar de onde provinham.

Após coloração de Gram das colónias isoladas, foram descartadas todas as constituídas por bactérias Gram positivas.

As bactérias Gram negativas foram analisadas tendo em conta a morfologia macroscópica das suas colónias, aspeto microscópico das bactérias e resultado de alguns testes bioquímicos.

As potenciais candidatas a causadoras da patologia foram submetidas a uma análise mais rigorosa sob a forma de Galerias API 20A (Biomerieux), indicadas para a identificação de bactérias estritamente anaeróbias.

### **2.3.2. Isolamento de *Brachyspira hyodysenteriae* (IIB)**

A preparação de meios seletivos para esta espécie foi feita de acordo com Metodologia descrita por Calderaro (2005) para isolamento de espiroquetas. Os meios agarosos foram preparados com uma base de TSA à qual foi adicionado sangue de carneiro desfibrinado para enriquecimento do meio e antibióticos para eliminar contaminações por outros microrganismos intestinais.

Meio BJ – TSA + 5% sangue carneiro desfibrinado + spectomicina (200µg/ml) + colistina (6.25µg/ml) + vancomicina (6.25µg/ml) + rifampicina (12.5µg/ml)

Meio BAM-SR – TSA + 7% sangue carneiro desfibrinado + spectomicina (400µg/ml) + rifampicina (30µg/ml)

As 5 zaragatoas e 4 amostras de fezes foram semeadas nestes dois meios e incubadas durante 72h a 42°C, sob condições de anaerobiose.

Estas 9 amostras foram sujeitas a PCR para detecção da espécie bacteriana em causa.

Depois da incubação, as placas foram observadas, fazendo-se as repicagens e testes necessários para identificar e isolar a espiroqueta.

## **2.4. Elaboração e Validação de Protocolos (III)**

Foi solicitado a elaboração de 2 protocolos para validação de Procedimentos:

- Limpeza e desinfecção de Salas e Equipamentos (Anexo 1), de forma a responder às exigências de cada uma das salas das novas instalações. A mudança de instalações obrigou a novos procedimentos de limpeza e

respetiva validação. Foi então elaborado um protocolo de validação para este procedimento, de acordo com protocolos antigos do LPVR, ajustado ao novo tipo de instalações e seus requisitos. O processo de validação tem uma duração de seis meses e foi iniciado em junho de 2015.

- Novo Protocolo para o Teste de Esterilidade do Produto Acabado (Anexo 2), com base nos descritos da Farmacopeia Europeia, mas em que se usasse apenas um meio de cultura (Farmacopeia refere o uso de diferentes meios para diferentes organismos). O principal ponto era então provar que com um mesmo meio de cultura generalista, se podia detetar todo o tipo de eventuais contaminações (tanto de fungos e leveduras como de bactérias aeróbias e anaeróbias).

#### **2.4.1. Limpeza e desinfeção salas e equipamentos (IIIA)**

##### **2.4.1.1. Amostragem automática de ar**

A amostragem de ar foi feita pelo amostrador de ar MAS 100 (MERCK), através da aspiração de 100 litros de ar de cada sala a controlar durante de 10min, em duplicado, para uma placa de TSA e SDA. Este processo foi repetido semanalmente durante 2 meses consecutivos. As placas de TSA e SDA foram incubadas durante 7 dias a 37°C e 25°C, respetivamente.

##### **2.4.1.2. Amostragem de ar por placas de exposição**

Através de placas de exposição de TSA, foi feita a amostragem de todos os equipamentos que, de alguma forma, estão em contacto direto com o produto – Câmaras e Tenda de Fluxo Laminar. Cada câmara/tenda em atividade foi monitorizada diariamente através de uma placa de meio TSA aberta, de forma a reter possíveis ufc do ar interior do equipamento. Cada placa foi exposta no máximo durante 4h de atividade e a incubação deu-se por 7 dias a 37°C.

##### **2.4.1.3. Amostragem de superfícies**

A amostragem microbiológica de superfícies deu-se também nas Câmaras/tenda de fluxo laminar, através de placa de contacto, durante 10segundos sob pressão homogénea e constante, em superfície previamente

exposta a um biocida durante 15 minutos. Cada placa de contacto foi incubada durante 7 dias a 37°C.

#### 2.4.1.4. Tratamento e análise de dados

Ao fim de 7 dias de incubação, foram contadas as colónias formadas em cada placa e calculado o número de unidades formadoras de colónia (ufc) aproximadas que existem no ar das salas analisadas. Os resultados foram registados num impresso próprio (Anexo 3).

### 2.4.2. Ensaio de esterilidade do Produto Acabado (IIIB)

Este ensaio pretende não só demonstrar que o produto final é estéril, mas também que a metodologia utilizada nos permite detetar uma possível contaminação microbiológica, nomeadamente que o meio de cultura utilizado no teste nos permite observar, por turbidez, que há crescimento microbiano e, portanto, que o produto final se encontra não-estéril.

#### 2.4.2.1. Sementeiras e incubação

Todo o manuseamento foi feito em condições de assepsia total, em câmara/tenda de fluxo laminar, utilizando sempre material estéril.

A - Controlo negativo: Pretende mostrar que o meio de cultura utilizado está em condições de esterilidade e, portanto, que não origina turbidez por si só. Incubou-se dois recipientes estéreis, cada um contendo 200ml de meio TSB, durante 14 dias, um deles a 37°C±2°C e outro a 25°C±2°C.

B - Controlo positivo/teste de promoção de crescimento: tem como o objetivo testar se o meio utilizado (TSB) é capaz de promover o crescimento de estirpes padrão (segundo Farmacopeia Europeia) com requisitos metabólicos distintos, que representam todas as estirpes utilizadas para produção das Vacinas de Rebanho. Foram feitas culturas das estirpes referência, determinada a concentração celular de cada uma delas e, depois, foram semeadas 100ufc também em 200ml de TSB conforme a seguir se apresenta:

Estirpe	Incubação	
<b>Bactérias aeróbias</b>	Temperatura	Duração
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa)	37°C±2°C	3 dias
<i>Bacillus subtilis</i> (Bs)		
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa)		
<b>Bactérias anaeróbias</b>		
<i>Clostridium sporogenes</i> (Cs)		
<b>Fungos e Leveduras</b>	25°C±2°C	5 dias
<i>Candida albicans</i> (Ca)		
<i>Aspergillus brasiliensis</i> (Ab)		

Tabela 1 – Estirpes de referência e respetivas condições de incubação, para teste de promoção de crescimento.

C - Ensaio de validação: Pretende avaliar se na presença da vacina, contendo conservante, se observa crescimento das estirpes incubadas e, portanto, que a atividade antimicrobiana do conservante não nos impede de observar uma possível contaminação do produto. Repetiu-se o procedimento do teste de promoção de crescimento e, a ele, adicionou-se uma quantidade de vacina que correspondesse a 20% do volume total de meio utilizado (20ml de vacina). Cada um dos 6 recipientes foi incubado durante 14 dias segundo as mesmas condições descritas na tabela 1.

D - Ensaio de esterilidade do produto: Tem como objetivo demonstrar se o produto está realmente estéril. Em dois recipientes estéreis, foram incubados 200ml de TSB juntamente com 20ml de vacina e foram incubados durante 14 dias, um deles a 37°C±2°C e outro a 25°C±2°C.

Num segundo ensaio, foram adicionados ainda 1ml de Tween 80 a cada um dos recipientes.

#### 2.4.2.2. Leitura de resultados

O resultado dos controlos positivos foi lido 3 dias após incubação para o caso das bactérias e 5 dias para as leveduras e fungos.



Os controlos negativos bem como ensaios de validação e de esterilidade do produto foram observados apenas 14 dias depois da realização do teste. Cada recipiente foi observado cuidadosamente de forma a perceber se havia ou não crescimento microbiana, por avaliação da turbidez. Os resultados foram registados num impresso próprio (Anexo 4).

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1. Otimização de protocolos de processamento (I)**

##### **3.1.1. Processamento de Zaragatoas oculares e retais (IA)**

Das 15 zaragatoas recebidas, 6 delas eram oculares, referentes a Queratoconjuntivite infecciosa e foram processadas individualmente, aquando do dia da sua chegada ao laboratório. As zaragatoas oculares (ZO) foram numeradas de 1 a 6: ZO1 a ZO6.

Após processamento segundo as duas metodologias, obtiveram-se os seguintes resultados:

Nas zaragatoas semeadas com base na Metodologia A (esfregação direto) observou-se crescimento de diferentes colónias bacterianas, bastante distintas, na placas de AS incubadas, sendo que não era possível individualizar todas as colónias observadas, dada a grande quantidade de material biológico existente nestas. Pelo facto de a colheita de material biológico ser feita na zona dos olhos dos animais infetados, continuamente expostos ao exterior, a existência de bactérias ambientais do ar leva a que a contaminação seja bastante elevada e, portanto, que na placa de petri haja crescimentos bastante heterogéneos. Assim, de todas as placas tentou isolar-se todas as colónias ou aglomerados destas morfologicamente diferentes.

Relativamente à metodologia B (diluição em água peptonada), as colónias desenvolvidas também apresentavam aspeto heterogéneo, mas encontravam-se na maioria das vezes individualizadas e passíveis de serem imediatamente isoladas, uma vez que a diluição em meio líquido é menos propícia de levar à formação de aglomerados de colónias bacterianas que a raspagem direta da zaragatoa no agar.

Os resultados obtidos foram registados, assim como o número de dias necessário até à finalização de cada uma das análises.

Zaragatoa	Metodologia	Resultados	Duração
ZO1	A	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Moraxella bovis</i> <i>Actinomyces pyogenes</i> <i>Rhodococcus equi</i>	5 dias
	B	<i>Moraxella bovis</i> <i>Actinomyces pyogenes</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	3 dias
ZO2	A	<i>Moraxella bovis</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	5 dias
	B	<i>Moraxella bovis</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	3 dias
ZO3	A	<i>Moraxella bovis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	4 dias
	B	<i>Moraxella bovis</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	3 dias
ZO4	A	<i>Moraxella bovis</i> <i>Actinomyces pyogenes</i>	4 dias
	B	<i>Moraxella bovis</i> <i>Actinomyces pyogenes</i> <i>Bacillus</i> sp.	3 dias
ZO5	A	<i>Moraxella bovis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	4 dias
	B	<i>Moraxella bovis</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	3 dias
ZO6	A	<i>Moraxella bovis</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Actinomyces pyogenes</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	5 dias
	B	<i>Moraxella bovis</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	4 dias

Tabela 2 – Isolados das Zaragatoas oculares, metodologia utilizada e duração da análise, em dias.

Sabendo-se que a patologia em causa (Queratoconjuntivite infecciosa) é causada por *Moraxella bovis*, apenas esta espécie foi tida em conta como resultado do diagnóstico, podendo afirmar-se que as duas metodologias testadas levaram a um mesmo resultado.

As análises efetuadas segundo a metodologia A demoraram entre 3 e 5 dias enquanto que, quando se utilizou a metodologia B, a duração das análises foi de apenas 3 dias, na maioria dos casos. Não houve nenhum caso em que a duração das análises a uma mesma zaragatoa, processada segundo as duas metodologias, fosse mais rápida quando se usou a metodologia A (Gráfico 1).

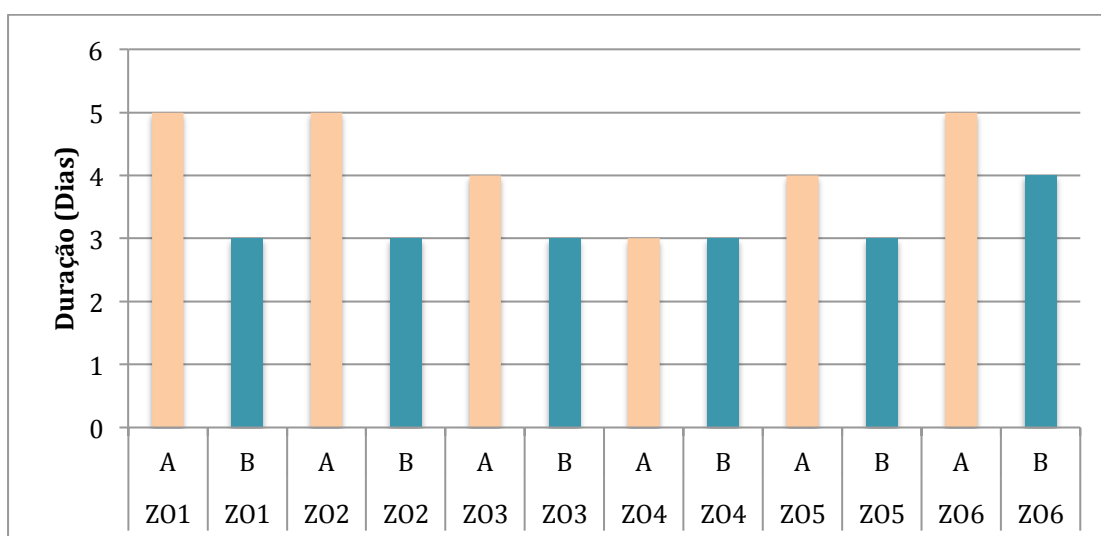


Gráfico 1 – Representação da duração das análises às zaragatoas oculares, pelas Metodologias A e B.

As 9 zaragatoas retais (ZR) foram numeradas de 7 a 15 (ZR7 a ZR15) e igualmente processadas aquando da sua chegada ao laboratório, segundo as mesmas metodologias (A e B).

Realizada a análise, com isolamentos e testes bioquímicos, os resultados obtidos foram os seguintes:

Zaragatoa	Metodologia	Resultados	Duração
ZR7	A	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica	5 dias
	B	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica <i>Corynebacterium sp.</i>	3 dias
ZR8	A	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica	6 dias
	B	<i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Clostridium perfringens</i>	4 dias
ZR9	A	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7 dias
	B	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica	4 dias
ZR10	A	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica <i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	4 dias
	B	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica	3 dias
ZR11	A	<i>Clostridium sp.</i> <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica	6 dias
	B	<i>Clostridium sp.</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica	4 dias
ZR12	A	<i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5 dias
	B	<i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica <i>Enterococcus faecalis</i>	3 dias
ZR13	A	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Enterococcus faecalis</i>	4 dias
	B	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	3 dias
ZR14	A	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica	4 dias
	B	<i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica	3 dias

		<i>Escherichia coli</i> $\beta$ hemolítica <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
ZR15	A	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica <i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	6 dias
	B	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium sp.</i> <i>Escherichia coli</i> $\alpha$ hemolítica	4 dias

Tabela 3 - Isolados das Zaragatoas retais, metodologia utilizada e duração da análise, em dias.

Dado que, no caso da metodologia B, se procede a uma diluição do material biológico, a concentração celular é diminuída. Portanto, no caso de espécies pouco representadas na amostragem, poderá não haver capacidade de desenvolvimento de uma colónia que se possa observar no meio de agar. Por outro lado, a diluição e o facto de a sementeira ser feita através de uma matriz líquida, permite que haja dispersão das bactérias no meio, com consequente possibilidade de estas se desenvolverem individualmente e permitirem a sua distinção a olho nu.

A aplicação da metodologia B no processamento das zaragatoas retais levou a uma análise consideravelmente mais eficiente e com uma duração de 1 a 3 dias inferior à análise da mesma amostra processada segundo a metodologia A (Gráfico 2).

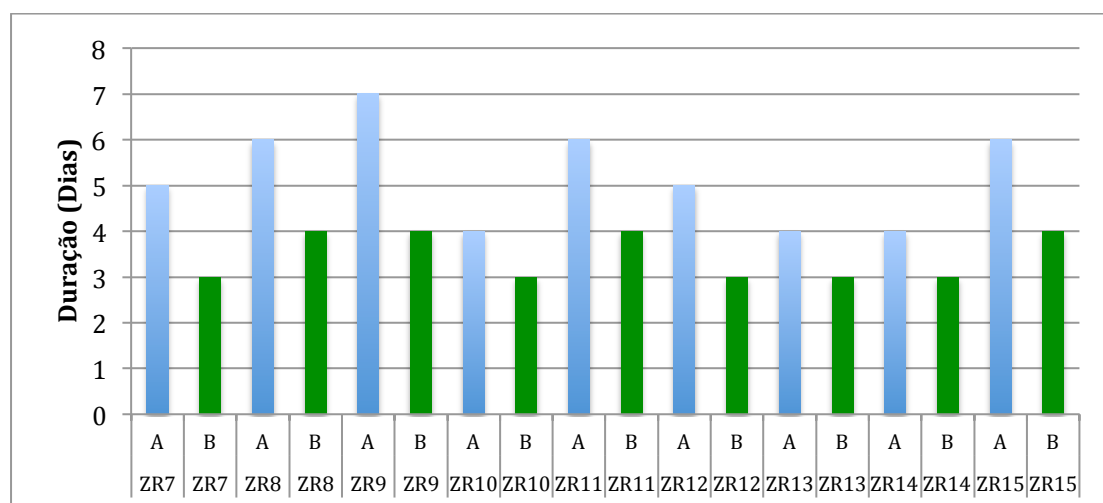


Gráfico 2 - Representação da duração das análises às zaragatoas retais, pelas Metodologias A e B.

No caso de colónias macroscopicamente semelhantes, se houver formação de aglomerados com estas colónias, nomeadamente pelo processamento segundo a metodologia A, a individualização e capacidade de as distinguir para isolamentos é mais difícil e pode levar a um diagnóstico defeituoso.

As patologias em causa, cujas amostras biológicas são representadas por zaragatoas retais, são causadas por estirpes de *Escherichia coli* e *Clostridium*. Sendo apenas estes tidos em conta nos resultados do diagnóstico microbiológico, a comparação das metodologias é feita segundo a capacidade de isolamento de estirpes destas espécies.

No caso da Zaragatoa ZR7, a Metodologia B permitiu-nos isolar uma estirpe do género *Corynebacterium*, além das também isoladas na Metodologia A. O género *Corynebacterium* não apresenta relevância nas patologias em causa, portanto, para esta zaragatoa, o resultado obtido foi o mesmo.

A ZR8 foi a única zaragatoa que nos levou a que fossem isoladas única e exclusivamente as mesmas 3 espécies.

Relativamente à metodologia A aplicada ao processamento da ZR9, obtivemos como isolado diferente a *Klebsiella pneumoniae*, não relevante para o diagnóstico. Na metodologia B isolou-se uma outra espécie de *Clostridium*, esta já relevante para o caso. Na metodologia A este *Clostridium* não foi isolado provavelmente devido às semelhanças morfológicas com o *Clostridium perfringens*, o que faz com que sejam passíveis de ser confundidas e tidas como uma mesma espécie.

Na análise da zaragatoa ZR10, quando se utilizou a metodologia A para o processamento, isolou-se uma estirpe de *Staphylococcus coagulase negativo*, além das duas estirpes de *Escherichia coli* estirpes também isoladas na metodologia B. Por não ser relevante para o diagnóstico, considerou-se que os resultados obtidos foram os mesmos para as duas metodologias aplicadas.

Nas ZR11 e ZR15, isolou-se também uma estirpe extra de *Clostridium* quando se utilizou o método de processamento B, pelas mesmas razões dadas na ZR9.

Nas análises às zaragatoas restantes (ZR13 e ZR14), verificou-se diferenças nos isolados provenientes das duas metodologias aplicadas. As estirpes diferenciais das duas metodologias, encontravam-se em pequena quantidade nas placas resultantes do processamento inicial e, por não se tratarem de estirpes significativas para a patologia, não foram tidas em conta para o resultado das análises.

Avaliando os testes de forma geral, tanto para patologias oculares como retais, verifica-se que, quando se adotou a metodologia A, se isolou um maior número de estirpes não significativas, ambientais ou pertencentes à flora natural dos animais.

Utilizando-se a metodologia B, foi possível identificar espécies de bactérias que, por formarem colónias passíveis de se individualizar a olho nu nas placas de Petri onde as zaragatoas foram processadas, nos permitiram uma distinção imediata e um consequente isolamento mais eficaz de diferentes espécies bacterianas clinicamente importantes.

Além das diferenças nos isolados, com vantagens significativas para a metodologia B, ao avaliar o tempo de duração de cada análise, desde o dia do processamento das amostras até à criopreservação das estirpes, é notória a diferença entre as duas metodologias aplicadas. Por ser possível avaliar individualmente cada colónia crescida nas placas resultantes do processamento segundo a metodologia B, este tipo de análise demorou na maioria dos casos, dois dias a menos do que quando se utilizou a metodologia A.

Um dia de diferença, significa também um menor necessidade de repicagens consecutivas para os isolamentos e, portanto, menos quantidade de material e tempo diário dispensados para a análise.



### 3.1.2. Processamento de Leites (IB)

Por muitas das mastites serem causadas por enterobactérias, o processamento dos leites é sempre efetuado em placas de AS e de agar Mck, em simultâneo.

A análise das amostras de leite é uma das mais complexas e demorosas, levando na maioria dos casos ao isolamento de muitas espécies bacterianas tanto infecciosas como ambientais, que podem estar na origem das infeções. Assim, salvo raras exceções como espécies do género *Bacillus*, estirpes de *Rhodococcus* e enterobactérias não-fermentadoras de glucose todos os isolados se consideram relevantes para o diagnóstico.

Das 92 placas iniciais, resultantes do processamento de cada uma das amostras segundo as duas metodologias, cada uma delas em AS e Mck, obteve-se um padrão comum. As placas resultantes da sementeira de 100µl de leite (Método A) apresentavam-se completamente cheias de colónias diversas, algumas individualizadas e outras em aglomerados, sendo possível agrupar algumas delas, com base na análise macroscópica, como pertencentes a uma mesma espécie (Fig. 2a e 2b).

Nas placas que foram semeadas com 10µl de leite (Método B), o número de colónias era bastante mais reduzido e, em cada placa, podia já fazer a discriminação do número aproximado de espécies bacterianas que ali estavam presentes (Fig. 3a e 3b).

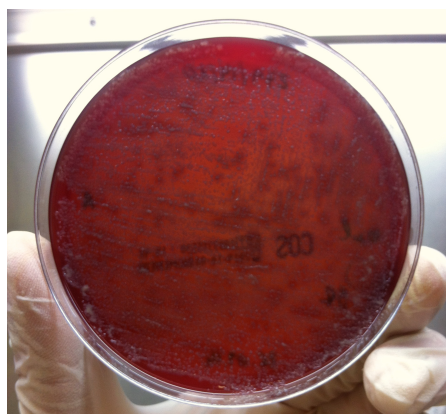


Fig.2a – Placa de AS resultante da sementeira de 100µl de leite.

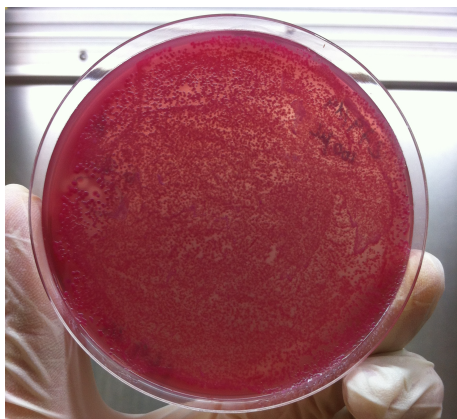


Fig. 2b - Placa de Mck resultante da sementeira de 100 $\mu$ l de leite.

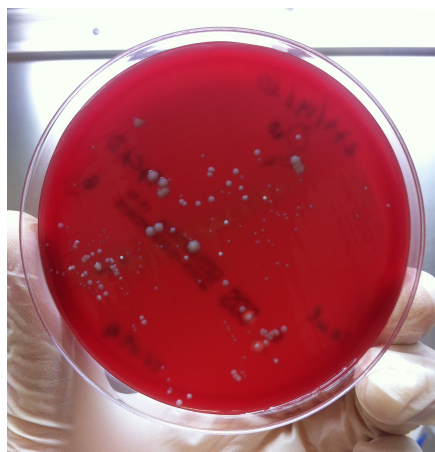


Fig.3a - Placa de AS resultante da sementeira de 10 $\mu$ l de leite

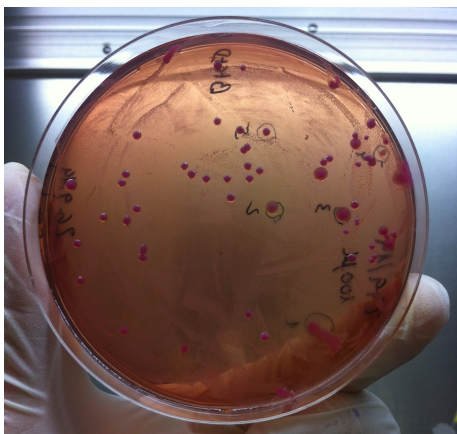


Fig.3b - Placa de Mck resultante da sementeira de 10 $\mu$ l de leite

As análises, segundo as duas metodologias, decorreram sob as mesmas condições e todas as placas tiveram um tempo e temperatura de incubação semelhantes.

Terminadas as análises microbiológicas a todas as amostras de leite e identificadas as espécies bacterianas, obtiveram-se os seguintes resultados:

Leite	Met. A	Met. B
1	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Klebsiella pneumoniae</i>
2	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Enterococcus sp.</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i>
3	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i>
4	<i>Corynebacterium bovis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Escherichia coli</i> b hemolítica	<i>Corynebacterium bovis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Escherichia coli</i> b hemolítica
5	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
6	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Yersinia enterocolitica</i>
7	<i>Serratia marcescens</i> <i>Yersinia sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica	<i>Serratia marcescens</i> <i>Yersinia sp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica
8	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> b hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>	<i>Corynebacterium sp.</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> b hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>
9	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>

	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica
10	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Staphylococcus aureus</i>
11	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>
12	<i>Serratia sp.</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>	<i>Serratia sp.</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i>
13	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica
14	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Streptococcus uberis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Escherichia coli</i> b hemolítica <i>Serratia rubidae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Streptococcus uberis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Escherichia coli</i> b hemolítica <i>Serratia rubidae</i>
15	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Yersinia sp.</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Yersinia sp.</i> <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
16	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica	<i>Staphylococcus</i> coagulase negativo <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica
17	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Yersinia sp.</i> <i>Serratia sp.</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Yersinia sp.</i> <i>Serratia sp.</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Staphylococcus</i> coagulase negativo
18	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Staphylococcus aureus</i>

	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Enterobacter aerogenes</i>
19	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica
20	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica	<i>Streptococcus uberis</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica
21	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Staphylococcus coagulase negativo</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica
22	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Staphylococcus coagulase negativo</i>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus uberis</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Staphylococcus coagulase negativo</i>
23	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Escherichia coli</i> a hemolítica <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Serratia marcescens</i>

Tabela 4 – Espécies bacterianas isoladas das amostras de leite, segundo as Metodologias A e B.

Em todas as análises às 23 amostras de leite se obteve o mesmo resultado utilizando as Metodologias A e B. Nas amostras 3, 5, 10, 16 e 22, quando se fez o processamento segundo a Metodologia A, além das espécies apresentadas na tabela 5, isolou-se espécies do género *Bacillus* e ainda de bactérias não-fermentadores de glucose que, por não serem patogenicamente relevantes, não foram contabilizadas para os resultados e tidas em conta na avaliação da equivalência das metodologias testadas.

Os testes para identificação de *Streptococcus agalactiae* utilizados no LPVR eram muitas vezes suscetíveis de originar dúvidas. A identificação presuntiva

de estirpes desta espécie baseava-se fundamentalmente na deteção da hemólise completa do meio agaroso AS pelas colónias. Muitas vezes a deteção desta capacidade hemolítica, por não ser clara, gerava dúvidas entre as espécies *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus dysgalactiae*. O teste rápido SLIDEX para *Streptococcus* do Grupo B (*S. agalactiae*) permitiu otimizar esta identificação. Através de uma reação de aglutinação de microesferas de latex, é possível saber se a estirpe pertence realmente à espécie *S. agalactiae*, podendo desta forma o médico veterinário sobre a possibilidade de haver então a presença deste agente infeccioso.

O facto de a identificação e seleção de colónias nas primeiras placas de Petri (onde se fez a sementeira dos leite) ser consideravelmente mais fácil por as colónias se apresentarem individualizadas e distribuídas pelo agar, levou a que, em média, as análises segundo a Metodologia A, fossem cerca de um a dois dias mais demoradas do que quando se utilizou a Metodologia B.

Uma análise mais rápida e consequente identificação das espécies representadas nas amostras processadas leva a que os médicos veterinários sejam mais rapidamente informados acerca dos resultados das análises e, por conseguinte, que a produção da Vacina de Rebanho resultante seja iniciada mais rapidamente e administrada aos animais em tempo útil.

## **3.2. Implementação de novas Metodologias de diagnóstico (II)**

### **3.2.1. Isolamento de estirpes causadoras de Pododermatite (IIA)**

Todas as 36 placas incubadas apresentavam crescimentos heterogéneos visíveis após as 72h de incubação a 37°C em anaerobiose. As placas de petri foram analisadas individualmente e, de cada uma, foram isoladas as colónias morfológicamente diferentes para placas não inoculadas, contendo o mesmo meio de agar.

Ao todo, das 36 placas, foi isolado um total de 194 colónias que foram sujeitas a coloração de Gram. Após a observação microscópica de cada uma delas, todas as colónias constituídas por cocos ou bacilos Gram positivos foram descartadas por não apresentarem compatibilidade a nível morfológico com qualquer uma das estirpes que se pretendia isolar. Aliados à coloração de Gram, foram feitos também testes para deteção da catalase e Citocromo C oxidase nas bactérias testadas. Nenhuma das 4 estirpes de interesse para o estudo possui qualquer uma destas, por isso todas as colónias com resultados positivos para estes testes foram também descartadas.

De todas estas colónias isoladas, apenas 97 eram constituídas por bacilos gram negativos sem catalase e Citocromo C oxidase e apenas estas seguiram análise, sendo semeadas novamente nos mesmos meios de agar e incubadas em condições de aerobiose.

72h depois, foram observados os crescimentos. Sabendo-se à partida que os agentes causadores de pododermatite são exclusivamente anaeróbios, testou-se a capacidade de cada estirpe em análise se desenvolver, no mesmo meio de agar, mas na presença de oxigénio. Das 97 colónias repicadas para novo meio de agar, 43 apresentavam, pós-incubação, crescimento significativo visível, com desenvolvimento de colónias de grandes dimensões, na presença de oxigénio. Foi feita a correspondência destas 43 colónias com as 97 estirpes em teste, e estas foram descartadas por não apresentarem características metabólicas coincidentes com nenhuma das estirpes que se queria isolar.

Desta forma, das 194 colónias iniciais, apenas 54 apresentavam características morfológicas e metabólicas compatíveis com as 4 estirpes que se pretendiam.

Estas colónias foram numeradas sequencialmente e distribuíam-se da seguinte forma:

Nº Zaragatoa	Nº Colónias compatíveis	Meio agar	Col. Gram
1	6	SchKV	cb-pequenos
			b-médios
		Sch	b-médios
			b-filamentosos
2	1	AS	b-médios
			cb-pequenos
3	4	SchKV	b-médios
		Sch	cb-pequenos
			b-filamentosos
4	7	SchKV	cb-pequenos
		Sch	b-médios
			b-filamentosos
			cb-pequenos
		AS	b-médios
5	6	SchKV	cb-pequenos
		Sch	cb-pequenos
			b-médios
			b-filamentosos
6	8	SchKV	b-médios
			cb-pequenos
		Sch	b-médios
		AS	b-médios
8	2	SchKV	cb-pequenos
		Sch	b-médios
10	2	Sch	b-filamentosos
		AS	b-médios
13	2	Sch	b-filamentosos
		AS	b-médios
15	4	Sch	b-filamentosos
		AS	cb-pequenos
			b-médios
16	2	Sch	b-filamentosos
		AS	cb-pequenos
17	8	SchKV	cb-pequenos
			b-médios
		Sch	b-médios
			cb-pequenos
		AS	b-médios
18	2	SchKV	cb-pequenos
		Sch	b-filamentosos

Tabela 5 – Colónias isoladas, segundo zaragatoa, meio de crescimento e coloração de Gram.



A análise da tabela mostra que o meio Sch foi o único que nos permitiu a observação e isolamento de bacilos Gram negativos filamentosos. Já o meio SchKV e AS, apesar de não sustentarem o crescimento deste tipo de bactérias, possibilitaram também o crescimento e detecção de bacilos Gram negativos médios e de bacilos cocóides Gram negativos pequenos.

Todas estas colónias foram semeadas nos 3 meios até então utilizados afim de se entender qual deles permitia sustentar crescimento mais rapidamente para todas elas. As novas placas foram incubadas a 37°C sob condições de anaerobiose. O crescimento foi observado a cada 24h e fez-se uma análise macroscópica das mesmas.

Verificou-se que, para todas as colónias, ao fim de 24h não havia crescimento visível. Depois das 48h, apenas se observou crescimento significativo nas placas de Petri com meios Sch e SchKV e apenas às 72h de incubação as placas de meio AS apresentavam crescimento comparável ao dos meios anteriores.

Verificando-se que o meio Schaedler, com e sem antibióticos, permitia sustentar um crescimento significativo mais rapidamente, concluiu-se que este contém características que lhe permitem sustentar um crescimento mais rápido destas estirpes anaeróbias. Dado isto, a análise prosseguiu apenas com as placas de Sch e SchKV, descartando-se as de AS.

Analisando os crescimentos, verificou-se ainda que algumas das estirpes, nomeadamente as constituídas por bacilos Gram negativos filamentosos não apresentavam crescimento em meio SchKV, provavelmente dada a sua sensibilidade aos antibióticos constituintes deste meio.

Foi feita a descrição macro e microscópica das colónias. Analisados os dados, verificou-se que, dadas as semelhanças macro e microscópicas, estávamos na presença de apenas 3 tipos de colónias (novamente numeradas) com as seguintes características:

	Aspeto AS	Aspeto Sch	Aspeto SchKV	Gram
1	Colónias muito pequenas branco-cinza	Colónias pequenas achatadas cinza	Sem crescimento visível	b-filamentosos
2	Colónias grandes mucosas amarelo-castanho	Colónias grandes mucosas amarelo-castanho	Colónias grandes mucosas amarelo-castanho	cb-pequenos
3	Colónias pequenas brancas com aspeto seco	Colónias pequenas branco-cinza	Colónias pequenas branco-cinza	b-médios

Tabela 6 – Aspeto geral dos 3 tipos de colónias isoladas.

De forma a prosseguir a análise e obter a identificação das estirpes, repicou-se uma colónia isolada de cada uma das 3 estirpes para meio Sch e incubou-se novamente segundo as condições anteriormente descritas durante 72h, afim de assegurar crescimento suficiente das colónias para a continuação da análise.

Das novas placas foi retirada uma porção de material biológico que foi diluído em ampolas de uma solução salina, de forma a obter um valor mínimo de 0,5 na escala de turbidez de McFarland (cerca de  $1,5 \times 10^8$  ufc/ml). Esta solução salina foi utilizada na preparação das Galerias API 20A (Biomerieux), que através do resultado de várias reações bioquímicas, descodificadas por mudanças de cor, nos dá uma identificação da espécie bacteriana testada.

Os resultados obtidos para a leitura das 3 Galerias API 20A foi o seguinte:

API 20A

REF: Db-filamentosas | 2.01.5 / 0.3 / 1.9

Origine / Source / Herkunft / Origen / Origen / Προέλευση / Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie:

IND URE GLU MAN LAC SAC MAL SAL XYL ARA GEL ESC GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE CAT SPOR GRAM COCC

Autres tests / Other tests / Andere Tests / Otras pruebas / Altri test / Outros testes / Άλλες εξετάσεις / Andra tester / Andre tests / Inne testy:

Oxidase (+)

Ident. / Ταυτοποίηση: Fusobacterium necrophorum

Fig.4 – Perfil Bioquímico da Colónia 1: *Fusobacterium necrophorum*

REF. 26 - *pequeno* 2.01.5 / 0.3 / 1.9

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

IND URE GLU MAN LAC SAC MAL SAL XYL ARA GEL ESC GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE CAT SPOR GRAM COCC

4 6 3 4 6 2 0 0

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy : Oxidase ⊖

Ident. / Ταυτοποίηση : *Prevotella melaninogenica*

Fig.5 - Perfil Bioquímico da Colônia 2: *Prevotella melaninogenica*

REF. 36 - *medico* 2.01.5 / 0.3 / 1.9

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

IND URE GLU MAN LAC SAC MAL SAL XYL ARA GEL ESC GLY CEL MNE MLZ RAF SOR RHA TRE CAT SPOR GRAM COCC

4 6 5 4 6 2 4 0

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy : Oxidase ⊖

Ident. / Ταυτοποίηση : *Bacteroides sp.*

Fig.6 - Perfil Bioquímico da Colônia 3: *Bacteroides* sp.

As três estirpes identificadas foram novamente semeadas em meio Sch e incubadas sob as condições descritas anteriormente, de forma a obter quantidade de material biológico suficiente para a sua criopreservação.

As estirpes, relevantes a nível patogénico, foram então criopreservadas aguardando decisão médico-veterinária para produção de uma vacina de rebanho.

### 3.2.2. Isolamento de *Brachyspira hyodysenteriae* (IIB)

A presença de *B.hyodysenteriae* em todas as amostras de foi confirmada por PCR (Laboratórios da FMV-UL).

Depois da primeira incubação verificou-se que todas as placas apresentavam crescimentos visíveis

As placas com meio BJ apresentavam-se com menos número de colónias, mas incluíam-se muitas estirpes contaminantes.

O meio BAM-SR tinha crescimento visível muito superior mas mais contaminações.

O facto de o meio BJ possuir maior diversidade de antibióticos na sua composição permitiu a inibição do crescimento de muitas estirpes contaminantes. No entanto, o meio BAM-SR, por ter uma concentração de sangue superior, levou a que o crescimento das colónias fosse mais rápido.

Todas as zonas com hemólise aparente (em ambos os meios) foram semeadas em BJ e em BJ modificado (7% sangue em vez dos 5%), afim de se tentar perceber se a concentração de sangue superior influenciaria a capacidade de crescimento das colónias.

Feita a nova incubação, verificou-se um maior crescimento nas placas com 7% de sangue. Todas as colónias, dos dois meios utilizados, foram observadas em microscopia de contraste de fase, afim de se tentar detetar a presença de espiroquetas.

Observou-se espiroquetas em todas as placas, porém em número reduzido. As placas foram novamente incubadas por mais 24h e observadas no dia seguinte.

Verificou-se que as zonas hemolisadas das placas correspondiam a zonas onde o crescimento bacteriano se dava por *swarming*, o que é compatível com *Brachyspira hyodysenteriae*.

Assim, estas zonas foram novamente repicadas para os mesmos meios de agar e incubadas novamente por 72h. A nova observação confirmou mais uma vez que as colónias apresentavam hemólise completa e *swarming*. Porém, a observação microscópica não permitiu a observação de espiroquetas. Ainda assim, e pelo facto de as características macroscópicas serem compatíveis com o que se pretendia, as placas seguiram para análises de PCR no mesmo laboratório para se proceder à confirmação.

Os resultados dos testes de PCR foram todos negativos para *Brachyspira hyodysenteriae* e por isso todas as amostras e placas de agar foram destruídas.

### 3.3. Elaboração e Validação de Protocolos (III)

#### 3.3.1. Limpeza e Desinfecção de Salas e Equipamentos (IIIA)

Tendo o processo de validação sido iniciado em junho de 2015, só foi feito o registo da monitorização ambiental durante 2 meses.

Os resultados obtidos nesse espaço temporal, para cada um dos três tipos de amostragem foram os seguintes:

- Amostragem automática de ar

Para cada uma das Salas/Laboratórios do LPVR foi feito um gráfico para registo do número de ufc detetadas no ar dos mesmos.

Salas de Classe C:

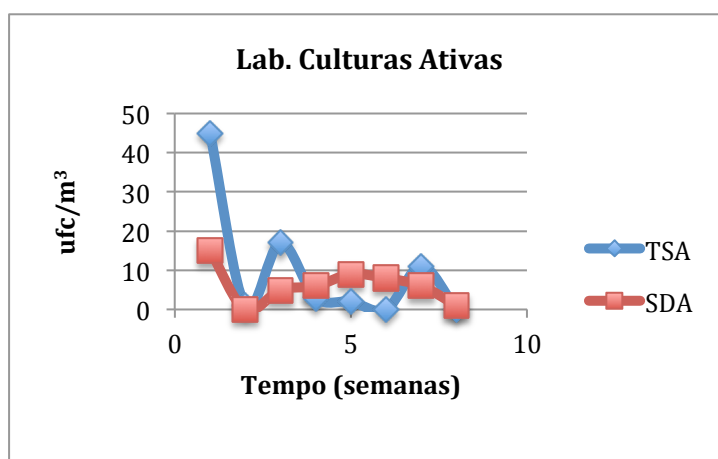


Gráfico 3 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Cult. Ativas

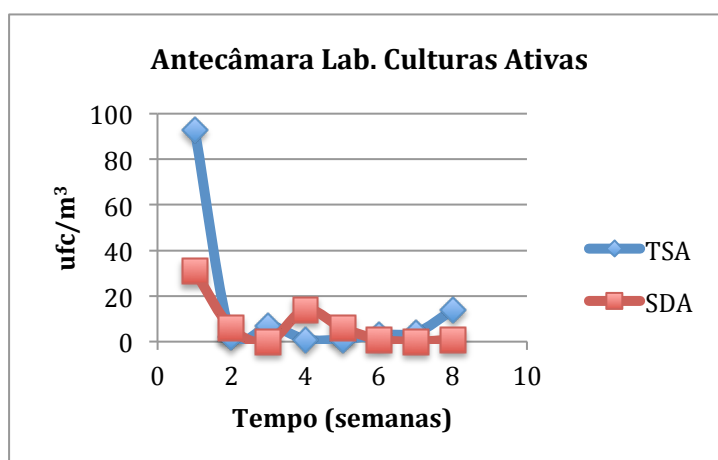


Gráfico 4 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Cult. Inativas

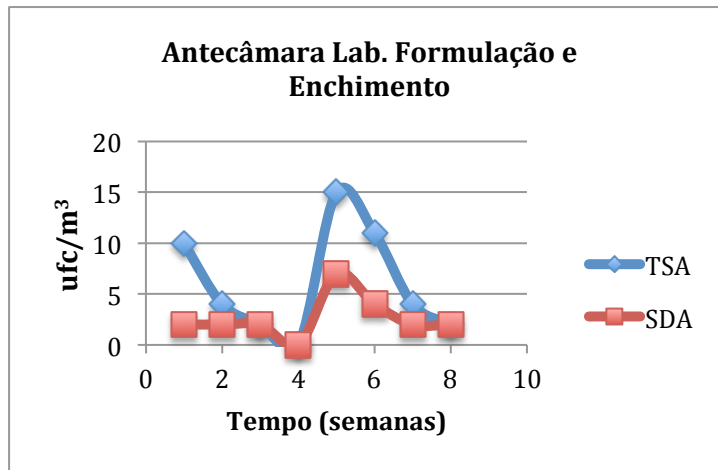


Gráfico 5 – Registos da amostragem automática de ar na antecâmara do Lab. de Formulação e Enchimento

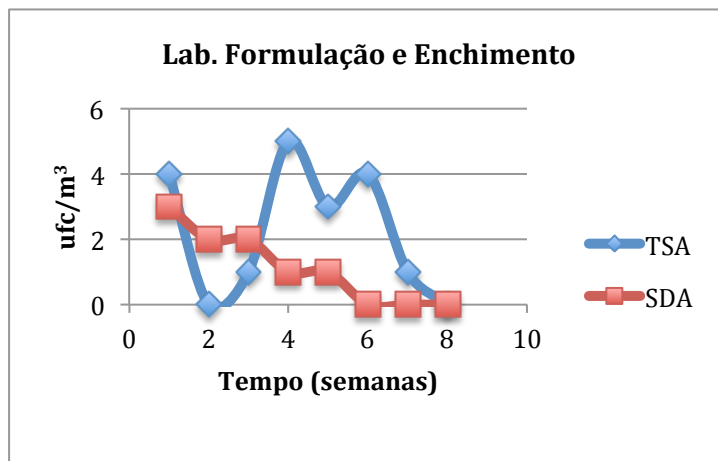


Gráfico 6 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Formulação e Enchimento

O limite de ufc/m<sup>3</sup> é 100. Em nenhum dos casos esse limite foi atingido. Verifica-se que o nível de colónias de fungos e leveduras (SDA) é quase sempre inferior ao de bactérias (TSA) o que poderá ser indicativo de uma limpeza menos eficiente na eliminação de bactérias. Nota-se ainda um número muito mais constante de fungos e leveduras em todas as salas durante as oito semanas, quando se compara com o número de bactérias, que sofre oscilações muito mais bruscas.

Salas de Classe D:

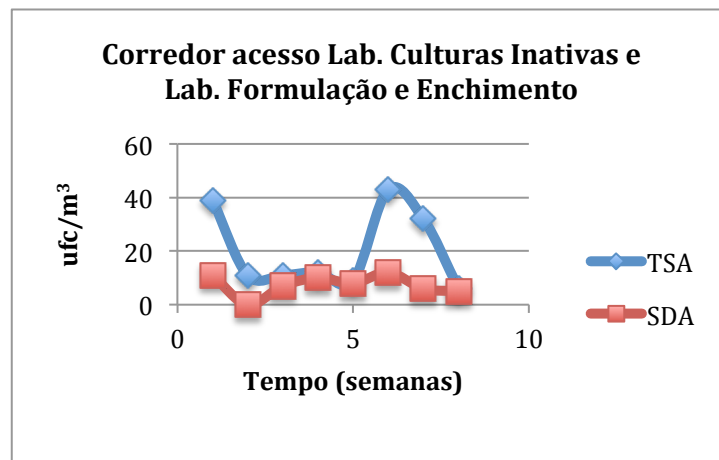


Gráfico 7 – Registos da amostragem automática de ar no corredor de aceso ao Lab. de Cult. Inativas e Lab. de Formulação e Enchimento

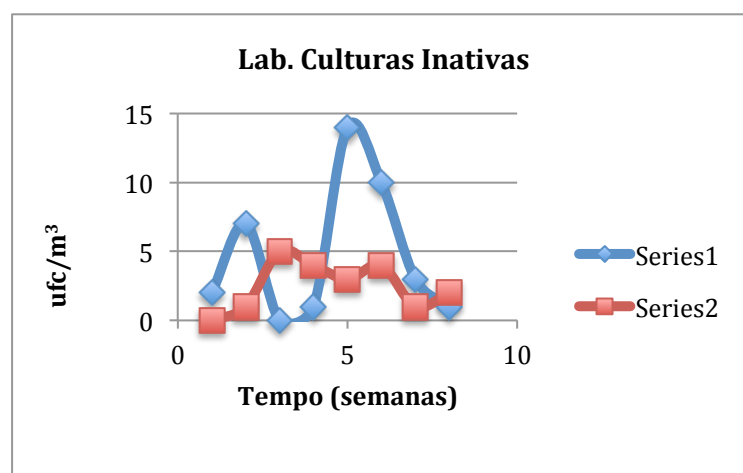


Gráfico 8 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Cult. Inativas

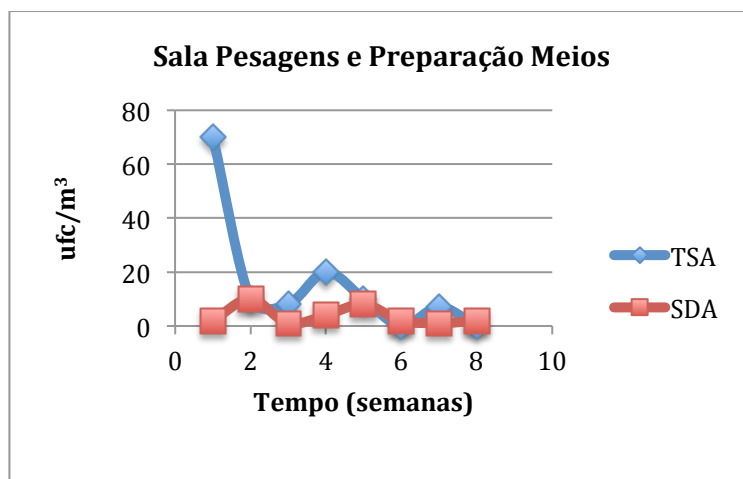


Gráfico 9 – Registos da amostragem automática de ar na Sala de Pesagens e Preparação de Meios

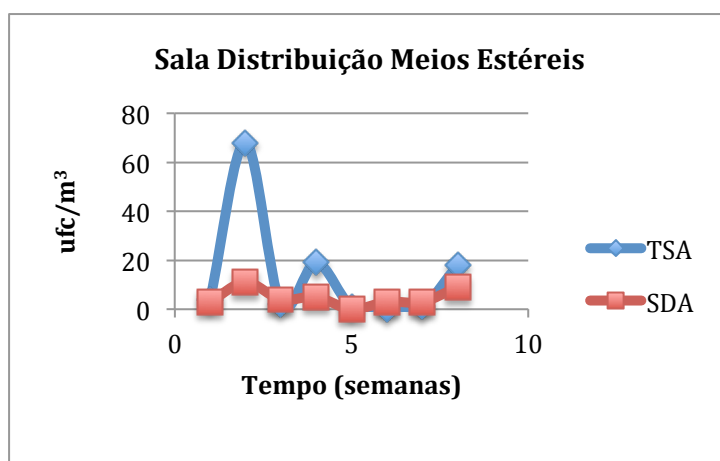


Gráfico 10 – Registos da amostragem automática de ar na Sala de Distribuição de Meios Estéreis

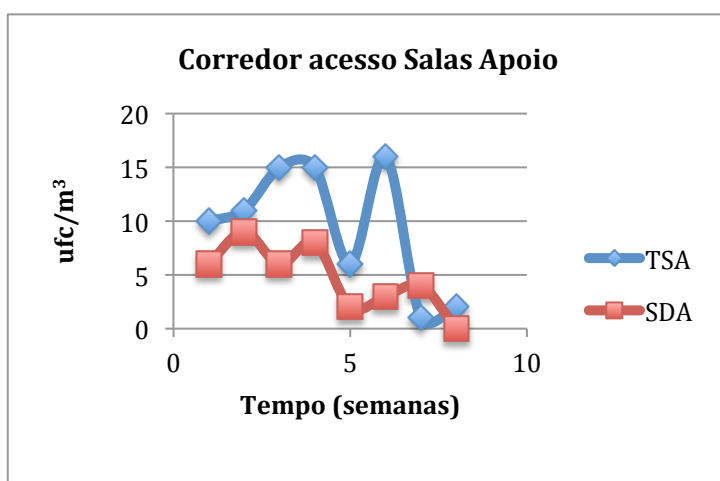


Gráfico 11 – Registos da amostragem automática de ar no Corredor de Acesso às salas de apoio



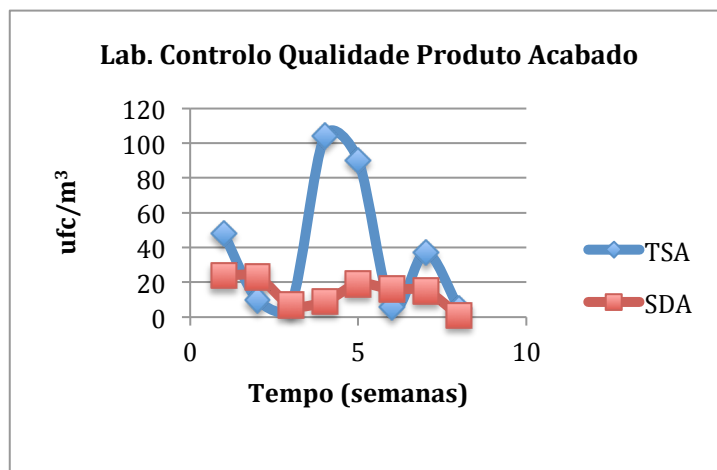


Gráfico 12 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Controlo de Qualidade do Produto Acabado

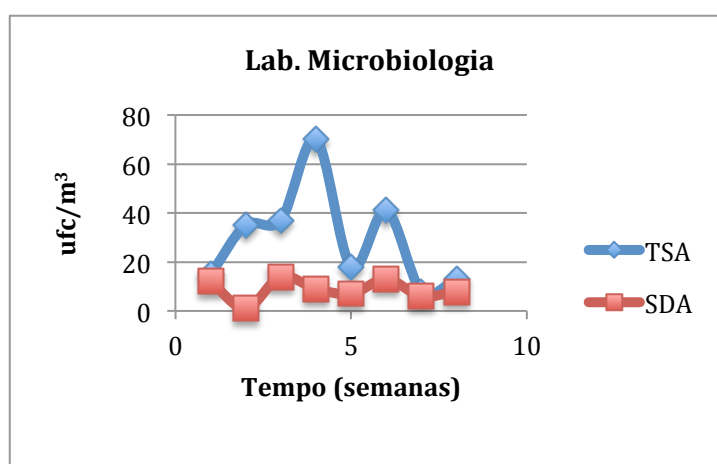


Gráfico 13 – Registos da amostragem automática de ar no Lab. de Microbiologia

Nas salas de Classe D, o limite de ufc/m<sup>3</sup> é 200. Mais uma vez, neste tipo de salas, as contagens ficaram sempre abaixo dos limites, revelando que as metodologias de limpeza são eficazes.

Ainda assim, nota-se também nestas salas que o número de fungos/leveduras é sempre inferior ao número de bactérias e que, mais uma vez, o número de bactérias é mais instável e tem mais picos ao longo das oito semanas.

- Amostragem de ar por placas de exposição

Por se tratarem de equipamentos de Classe A, o limite de ufc nas CFL/TFL é de zero.

Por cada 4 horas de atividade, foi usada uma placa de TSA para monitorizar a qualidade do ar interior das CFL/TFL. De um total de 147 placas usadas na monitorização, nenhuma delas apresentou qualquer crescimento de colónias, o que revelou que o ar interior destes equipamentos era realmente estéril.

- Amostragem de superfícies

Da amostragem da superfície das CFL/TFL, realizada semanalmente, obteve-se os seguintes resultados:

Semana	CFL L.Cult.Ativas	TFL L.Formul.Ench.	CFL L.Cult.Inativas	CFL L.D.Meios Estéreis	CFL L.Microbiologia
1	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	1
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	1
7	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0

Tabela 7 – Registo da amostragem de superfícies nas CFL/TFL durante as 8 semanas.

Na semana 2 observou-se o crescimento de uma colónia de fungo na placa de contacto correspondente à CFL do Laboratório de Microbiologia. Como medida corretiva, passou a utilizar-se um Biocida com propriedades antifúngicas e verificou-se que, na semana a seguir, já não houve qualquer crescimento. Na semana 6 voltou a haver registo de uma colónia, desta vez bacteriana, na placa de contacto do Laboratório de Microbiologia. Apesar de a colónia se encontrar nas margens do agar e, aparentemente, se tratar de um contaminante ambiental (*Rhodococcus equi*), utilizou-se como medida

corretiva a atuação do Biocida durante 15 minutos, em vez dos 5 minutos estabelecidos em procedimento. Nas duas semanas seguintes não se observou qualquer crescimento.

### 3.3.2. Ensaio de esterilidade do Produto Acabado (IIIB)

Terminadas as incubações de todos os recipientes, os resultados obtidos foram os seguintes:

Teste	Incubação	Crescimento (por turvação)
A	TSB 37°C+-2°C	-
	TSB 25°C+-2°C	-
B	TSB + Sa 37°C+-2°C	++
	TSB + Bs 37°C+-2°C	++
	TSB + Pa 37°C+-2°C	++
	TSB + Cs 37°C+-2°C	++
	TSB + Ca 25°C+-2°C	++
	TSB + Ab 25°C+-2°C	++
C	TSB + vacina + Sa 37°C+-2°C	-
	TSB + vacina + Bs 37°C+-2°C	-
	TSB + vacina + Pa 37°C+-2°C	-
	TSB + vacina + Cs 37°C+-2°C	-
	TSB + vacina + Ca 25°C+-2°C	-
	TSB + vacina+ Ab 25°C+-2°C	-
D	TSB + vacina 37°C+-2°C	-
	TSB + vacina 25°C+-2°C	-

Tabela 8 – Resultados da validação do Ensaio de esterilidade. (-)sem crescimento, (+)crescimento ligeiro, (++)crescimento acentuado.

Uma vez que as vacinas criam naturalmente um depósito (o adjuvante é uma substância densa), em alguns casos o crescimento bacteriano era dúbio.

Para confirmação dos resultados apresentados na tabela 2, semeou-se 100ul do conteúdo de cada um dos recipientes em placas com TSA e incubou-se durante 5 dias a 37°C (para bactérias aeróbias e anaeróbias) e 25°C (para fungos e leveduras). Só houve crescimento nas placas correspondentes ao teste B, o que provou que os resultados anteriores se confirmavam.

Para que o teste se considerasse validado, era necessário que, no teste C houvesse um crescimento semelhante ao que se obteve no teste B. Isto não aconteceu uma vez que a atividade microbiana do conservante da vacina não permitiu que as 100ufc incubadas se desenvolvessem no meio.

Para que o teste seja validado, é necessário que a atividade antimicrobiana do tiomersal seja previamente neutralizada e o teste repetido segundo as mesmas condições.

Por outro lado, o teste permitiu-nos concluir que o meio utilizado é válido para este ensaio uma vez que permite sustentar o crescimento de diferentes estirpes bacterianas, tanto aeróbias como anaeróbias, e de fungos e leveduras, aquando da incubação às temperaturas mencionadas na Tabela 1.

Uma vez que o teste C não apresentou crescimento visível, não nos é também possível determinar se o produto final estava realmente estéril ou se o crescimento de possíveis contaminantes foi também inibido pela ação antimicrobiana do conservante.

Perante os resultados obtidos, foi então ajustado o Protocolo e repetiu-se o ensaio adicionando-se 1ml de Tween 80 (um detergente que vai anular a atividade antimicrobiana do conservante) a todos os recipientes, de forma a neutralizar a atividade antimicrobiana do conservante.

Os resultados foram lidos 14 dias depois:

Teste	Incubação	Crescimento (por turvação)
A	TSB + T80 37°C+-2°C	-
	TSB + T80 25°C+-2°C	-
B	TSB + Sa + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + Bs + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + Pa + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + Cs + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + Ca + T80 25°C+-2°C	++
	TSB + Ab + T80 25°C+-2°C	++
C	TSB + vacina + Sa + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + vacina + Bs + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + vacina + Pa + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + vacina + Cs + T80 37°C+-2°C	++
	TSB + vacina + Ca + T80 25°C+-2°C	++
	TSB + vacina+ Ab + T80 25°C+-2°C	++
D	TSB + vacina + T80 37°C+-2°C	-
	TSB + vacina + T80 25°C+-2°C	-

Tabela 9 – Resultados da validação do Ensaio de esterilidade, com adição de Tween 80. (-)sem crescimento, (+)crescimento ligeiro, (++)crescimento acentuado.

Os crescimentos foram semelhantes nos testes B e C, o que provou que a atividade antimicrobiana do conservante foi anulada, que a vacina estava estéril e que o Protocolo se encontra validado.

## 4. Conclusão e Perspetivas Futuras

Os Protocolos para processamento de zaragatoas, tanto de origem ocular como de origem retal, estabelecidos no LPVR permitem a análise microbiológica e consequente isolamento de estirpes patogénicas. As novas Metodologias propostas permitem, da mesma forma, que os agentes sejam isolados para posterior produção de Vacinas de Rebanho. Num total de 15 amostras analisadas, verificou-se que o somatório da duração (em dias) das análises foi superior em 23 dias quando se utilizou a metodologia A, em relação à metodologia B (Gráfico 14).

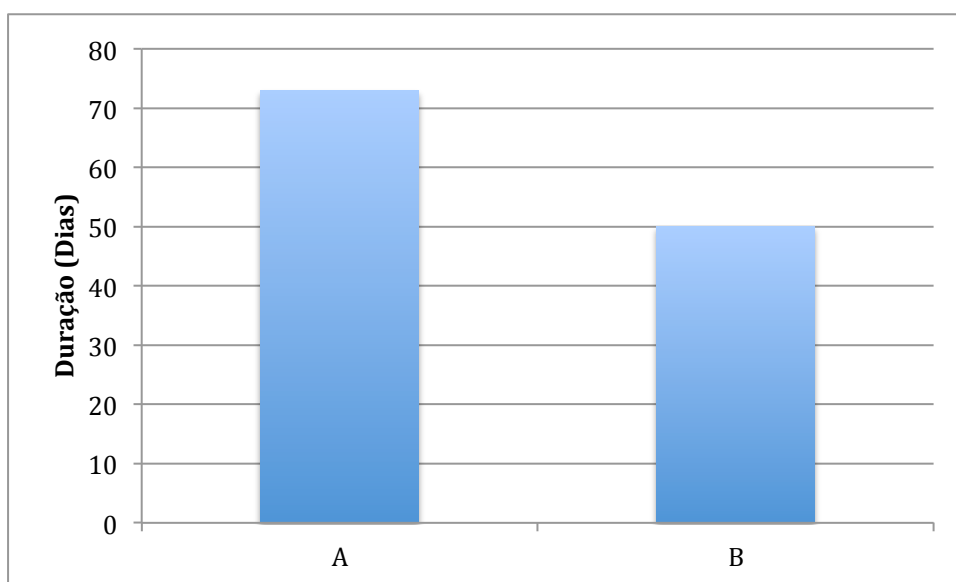


Gráfico 14 – Duração total das análises a zaragatoas, segundo as metodologias A e B.

Os ganhos inerentes à utilização da Metodologia B para futuras análises a zaragatoas recebidas no LPVR, levará então a uma maior rapidez de resposta do Laboratório perante os clientes e ainda a vantagem de haver um menor gasto de tempo e material por parte dos Técnicos responsáveis pelas análises. Em situações críticas nas quais os clientes apresentam constantemente queixas sobre mortes e mau estar de animais, esta nova metodologia poderá funcionar como um incentivo para futuras análises no

LPVR bem como a possibilidade de as estirpes isoladas seguirem mais rapidamente para a produção de Vacinas de Rebanho, estando este produto mais rapidamente disponível para administração aos animais.

Também a Metodologia alternativa testada para processamento de amostras de leite se revelou eficaz não só em termos de eficácia, mas também de rapidez na obtenção de resultados.

Analisando mais uma vez as análises efetuadas às 23 amostras de leite recebidas, verifica-se um ganho total de um a dois dias por cada amostra analisada.

No que diz respeito à Pododermatite, a utilização do meio Sch e SchKV foi fundamental para se isolar as estirpes patogénicas.

As técnicas de análise testadas durante este trabalho vão possibilitar que este tipo de amostras biológicas, que chegam todos os anos ao LPVR, sejam processadas e analisadas de uma forma eficaz e seja feito o isolamento das estirpes que estão a causar doença nos animais de cada rebanho. O próximo passo assenta essencialmente no estudo da capacidade de um meio líquido para as culturas das espécies bacterianas fastidiosas isoladas, que nos permita obter as concentrações celulares necessárias para a produção de uma Vacina de Rebanho eficaz para os animais. Foi já adquirido pelo LPVR um meio de cultura líquido (Schaedler Broth), com a mesma composição do meio agaroso Sch à exceção do sangue de ovelha, que se mostrou capaz de sustentar o crescimento e manutenção de culturas de *Prevotella melaninogenica* e *Bacteroides sp.* isolados durante este trabalho. Resta agora testar a capacidade deste meio sustentar a cultura de *Fusobacterium necrophorum*, bem como adaptar os procedimentos da Produção de Vacinas de Rebanho e testes de Controlo de Qualidade para estas estirpes, de forma a que etapas como os controlos em processo se mostrem eficazes e indicativas do estado e qualidade das etapas de produção.

Relativamente ao isolamento de *Brachyspira hyodysenteriae*, verificou-se que os meios de agar utilizados não são suficientemente ricos para sustentar o crescimento destas espiroquetas. É essencial perceber as necessidades metabólicas deste organismo para que se possa encontrar um meio adequado para o seu crescimento, bem como perceber quais as possíveis contaminações que podem ser encontradas nas amostras de forma a que se

faça um tratamento prévio destas, eliminando o maior número de bactérias não relevantes para que se possa isolar a *B.hyodysenteriae* das amostras. Depois de esta etapa ser ultrapassada, será mais uma vez necessário encontrara um meio de líquido para manter as culturas e adaptar também os procedimentos da Produção de Vacinas de Rebanho e testes de Controlo de Qualidade, de forma a possibilitar a produção de uma nova vacina no LPVR que permita combater esta patologia em suínos.

No que diz respeito ao Protocolo de Validação do Ensaio de Esterilidade do Produto acabado, pode concluir-se que a utilização de TSB para a realização do mesmo permite sustentar crescimentos de microrganismos variados, permitindo detetar as eventuais contaminações no produto. O teste considera-se validado e o teste poderá ser aplicado à rotina.

O Protocolo de validação da limpeza e desinfeção de salas e equipamentos deverá decorrer durante pelo menos mais quatro meses, afim de se perceber se os procedimentos aplicados são realmente eficazes e permitem que os laboratórios e os equipamentos operem de forma segura e não-contaminada.



## 5. Referências Bibliográficas

<sup>1</sup> - Ven, G., Nes, A. *The use of autogenous vaccines in the Dutch pig industry and suggestions for new legislation of autogenous vaccines*. Utrecht University.

<sup>2</sup> - Davidson, H. J., Stokka, G. L. (2003) *A field trial of autogenous Moraxella bovis bacterin administered through either subcutaneous or subconjunctival injection on the development of keratoconjunctivitis in a beef herd*. Can Vet J. 2003. 44, p. 577-580.

<sup>3</sup> - Checkley, S. L., Janzen, E. D., Campbell, J. R., McKinnon, J. J. (2005) *Efficacy of vaccination against Fusobacterium necrophorum infection for control of liver abscesses and footnote in feedlot cattle in western Canada*. Can Vet J. 46, p. 1002-1007.

<sup>4</sup> - Osorio, J., Hidalgo, A., Pappaterra, G.J., Llanos, A., Marca, J., Ferro, A., Dávila, C., Carvajal, A. and Rubio, P. (2007) *Control of swine dysentery with an autogenous bacteria of Brachyspira hyodysenteriae in Iberian pigs*.

<sup>5</sup> - Hurtado, P.M.A., Piriz, D.S., Valle, J., Vadillo, S. (1997) *A vaccine for footrot, procedure for the preparation thereof, and applications*. Univ. Extremadura (ES).

<sup>6</sup> - Maas, J. (2009) *Treating and preventing footrot in cattle*. UCD vet views - California Cattlemen's magazine.

- <sup>7</sup> - Machado, V.S, Bicalho, M.L.S., Meira Junior, E.B.S, Rossi, R., Ribeiro, B.L., Lima, S., Santos, T., Kussler, A., Foditsch, C., Ganda, E.K., Oikonomou, G., Cheong, S.H., Gilbert, R.O., Bicalho, R.C. (2014) *Subcutaneous Immunization with Inactivated Bacterial Components and Purified Protein of Escherichia coli, Fusobacterium necrophorum and Trueperella pyogenes Prevents Puerperal Metritis in Holstein Dairy Cows*. PLoS ONE. 9(3), p. e91734.
- <sup>8</sup> - Borku, M.K., Ozkanlar, Y., Hanedan, B., Duru, S.Y. (2007) *Efficacy of staphylococcal bacteria for treatment of canine recurrent pyoderma: an open clinical trial*. Revue Méd Vet.158(5), p. 234-238.
- <sup>9</sup> - Curtis, C.F., Lamport, A.I., Lloyd, D.H. (2006) *Masked. controlled study to investigate the efficacy of a Staphylococcus intermedium autogenous bacteria for the control of canine idiopathic recurrent superficial pyoderma*. European Society of Veterinary Dermatology. 17, p. 163-168.
- <sup>10</sup> - Ghosh, S., LaPara, T. M. (2007) *The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria*. The ISME Journal. 1(3) p. 191-203.
- <sup>11</sup> - Khachatourians, G.G. (1998) *Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria*. Canadian Medical Association Journal. 159(9), p. 1129-1136.
- <sup>12</sup> - Kummerer, K. (2003) *Significance of antibiotics in the environment*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 52(2), p. 317-317.
- <sup>13</sup> - Mellenberger, R.W. (1977) *Vaccination Against Mastitis*. Journal of Dairy Science. 60(6), p. 1016-1021.
- <sup>14</sup> - Nascimento, G., Maestro, V., Campos, M. (2001) *Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP*. Revista de Nutrição. 14(2).

- <sup>15</sup> - Lederer, J. (1991) *Enciclopédia moderna de higiene alimentar*. São Paulo : Manole.
- <sup>16</sup> - Kautz, F.M., Nickerson, S.C., Ely, L.O., *Vaccination as a Tool to Reduce Mastitis and Improve Milk Quality in Dairy Goats*.
- <sup>17</sup> - De Paoli, P. (2005) *Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research*. FEMS Microbiology Reviews. 29(5), p. 897-910.
- <sup>18</sup> - Godden, S.M., Jansen, J.T., Leslie, K.E., Smart, N.L., Kelton, D.F. (2002) *The effect of sampling time and sample handling on the detection of Staphylococcus aureus in milk from quarters with subclinical mastitis*. Can Vet J. 43, p. 38-42.
- <sup>19</sup> - Pezzanite, L., Neary, M., Hutchens, T. (2009) *Footrot in Sheep and Goats*. Animal Sciences - University of Kentucky.
- <sup>20</sup> - Whittier, D., Umberger, S.H. (2009) *Control, Treatment, and Elimination of Foot Rot from Sheep*. College of Veterinary Medicine - VirginiaTech.
- <sup>21</sup> - Lacombe-Antoneli, A., Píriz, S., Vadillo, S. (2006). *Aetiology of caprine footrot in Extremadura region, Spain*. Acta Veterinaria Hungarica, 54(3), p.313-320.
- <sup>22</sup> - Togoe, I., Tudor, L., Galis, A. (2008). *Investigations concerning the isolation of Fusobacterium necrophorum stems from pedal affections of cattle*. Lucrari stiintifice medicina veterinara, XLI, p.960-966.
- <sup>23</sup> - Gradin, J., Schmitz, J. (1977). *Selective medium for isolation of Bacteroides nodosus*. Journal of Clinical Microbiology, 6(3), p.298-302.

- <sup>24</sup> - Jansson, D. (2004). *Brachyspira hyodysenteriae* and other strongly - haemolytic and indole-positive spirochaetes isolated from mallards (*Anas platyrhynchos*). Journal of Medical Microbiology, 53(4), p.293-300.
- <sup>25</sup> - Lugsomya, K., Tummaruk, P., Hampson, D., Prapasarakul, N. (2012). *Development of a modified selective medium to enhance the recovery rate of Brachyspira hyodysenteriae and other porcine intestinal spirochaetes from faeces*. Letters in Applied Microbiology, 54(4), p.330-335.
- <sup>26</sup> - Calderaro, A., Merialdi, G., Perini, S., Ragni, P., Guégan, R., Dettori, G., Chezzi, C. (2001). *A novel method for isolation of Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae from pigs with swine dysentery in Italy*. Veterinary Microbiology, 80(1), p.47-52.
- <sup>27</sup> - Calderaro, A., Bommezzadri, S., Piccolo, G., Zuelli, C., Dettori, G., Chezzi, C. (2005). *Rapid isolation of Brachyspira hyodysenteriae and Brachyspira pilosicoli from pigs*. Veterinary Microbiology, 105(3-4), p.229-234.
- <sup>28</sup> - Brooke, C. (2003). *Evaluation of selective media for the isolation of Brachyspira aalborgi from human faeces*. Journal of Medical Microbiology, 52(6), p.509-513.
- <sup>29</sup> - Hampson, D. (2004). *Brachyspira research - special issue on colonic spirochaetes of medical and veterinary significance*. Journal of Medical Microbiology, 53(4), p.263-265.
- <sup>30</sup> - Stanton, T. (2011). *Isolation and maintenance of Brachyspira species*. Current Protocols in Microbiology.
- <sup>31</sup> - Colodel, E., Driemeier, D., Schmitz, M., Germer, M., Nascimento, R., Assis, R., Lobato, F., Uzal, F. (2003). *Enterotoxemia em caprinos no Rio Grande do Sul*. Pesq. Vet. Bras., 23(4), p.173-178.

- <sup>32</sup> - Magalhães, H., Queiroz de Freitas, M., Gonçalves, W. (1991). *Ocorrência, aspectos bacteriológicos e histopatológicos na colibacilose de bezerros*. Pesq.Agropec.Bras, 26(4), p.555-564.
- <sup>33</sup> - Contreras, G., Rodríguez, J. (2011). *Mastitis: Comparative Etiology and Epidemiology*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 16(4), p.339-356.
- <sup>34</sup> - Keefe, G. (1997). *Streptococcus agalactiae mastitis: A review*. Can Vet J, 38.
- <sup>35</sup> - Hirsh, D., Zee, Y., Coutinho, A. (2003). *Microbiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- <sup>36</sup> - Quinn, P. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. Oxford: Blackwell Science.
- <sup>37</sup> – Dossier Técnico (2015). MEDINFAR-SOROLÓGICO,S.A.
- <sup>38</sup> - Operating Manual MAS-100. MERCK

# ANEXOS

# ANEXO 1



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

### 1. Objectivo

Este protocolo descreve o modo de proceder de modo a estabelecer evidência documentada que permita garantir com elevado grau de segurança que os procedimentos de limpeza utilizados no laboratório produtor de autovacinas e vacinas de rebanho (LPVR) da Medinfar-Sorológico são eficazes na redução e/ou eliminação, de forma consistente, da contaminação microbiológica das superfícies e do ar, de acordo com as especificações pré-definidas em função da classificação das áreas em que se encontram, conforme definido no Anexo 1 do Guia para as Boas Práticas de Fabrico (Eudrallex, Volume 4).

### 2. Aplicação

Este protocolo aplica-se à validação do procedimento de limpeza e desinfecção das salas e dos equipamentos do LPVR (BPL 130006).

### 3. Definições

CFL: Câmara de Fluxo Laminar

TFL: Tenda de Fluxo Laminar

SDA: *Meio Sabouraud Dextrose Agar*

TSA: *Meio Tryptin Soy Agar*

UFC: Unidades Formadoras de Colónias

IPA: Solução estéril de álcool isopropílico a 70% (v/v) em água

### 4. Referências

Eudrallex Volume 4, Anexo 1 – *Manufacture of Sterile Medicinal Products*.

BPL 130006: Desinfecção e Limpeza das Salas e Equipamentos.

BPL 130017: Monitorização Ambiental.

MOD 1308: Controlo Ambiental Extraordinário.

MOD 1312: Plano Semanal de Controlo Ambiental.

### 5. Responsabilidades

O Responsável de Controlo da Qualidade é responsável por executar o descrito neste protocolo. A Direção Técnica é responsável por elaborar o relatório final.

### 6. Modo operativo

A monitorização da eficácia da limpeza e desinfecção é efectuada com base nas metodologias e critérios utilizados para a monitorização ambiental, descritos no 'BPL 130017'.





## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

- Durante 6 meses, após a limpeza semanal das salas e superfícies, são recolhidas amostras de ar e das superfícies de trabalho.
- As amostras recolhidas são avaliadas para aferição da contaminação microbiológica.

### 6.1 Métodos de monitorização microbiológica utilizados

#### Monitorização automática da qualidade do ar

Para a monitorização do ar dos laboratórios e salas, utilizar o amostrador de ar de acordo com o 'BPL 130017', utilizando duas placas de 90 mm, uma com TSA e outra com SDA. O volume de ar amostrado é de 1 m<sup>3</sup> para cada placa.

#### Monitorização da qualidade do ar utilizando placas de exposição

A monitorização do ar das CFL e da TFL é efectuada sempre que estejam a operar dentro das mesmas. O operador tem de colocar uma placa de 90 mm com TSA aberta dentro da CFL (período máximo de exposição de 4 horas), que permite detectar a existência de microrganismos através da sua sedimentação.

#### Monitorização das superfícies

Para a amostragem das superfícies de trabalho, proceder da seguinte forma:

- Retirar uma placa do blister e comprimir o agar no ponto de amostragem definido para esta superfície a amostrar durante 10 segundos, assegurando uma pressão homogénea em toda a placa.
- Limpar com IPA as zonas onde a placa esteve em contacto.

### 6.2 Locais de amostragem e periodicidade

#### **6.2.1 Monitorização microbiológica das CFL e TFL (classe A):**

A monitorização da qualidade do ar das CFL e da TFL é efectuada diariamente enquanto se opera. As placas devem estar expostas por um período máximo de exposição de 4 horas.

A amostragem de superfícies das CFL e da TFL é efectuada semanalmente com uma placa de contacto com meio rico. O operador deve amostrar a superfície de cada equipamento de forma aleatória.

#### **6.2.2 Monitorização microbiológica das salas de Classe C:**

Semanalmente, é efectuada a monitorização microbiológica em atividade nas salas/laboratórios de Classe C, de acordo com as indicações da tabela 1.



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

**Tabela 1** – Monitorização semanal de rotina nas salas/laboratórios de Classe C.

Área a monitorizar	Classe	Método de amostragem
Antecâmara do Laboratório de Formulação e Enchimento	C	Amostragem automática de ar
Laboratório de Formulação e Distribuição	C	Amostragem automática de ar
Mesa da Tenda do Laboratório de Formulação e Enchimento	C	Amostragem de superfície
Antecâmara	C	Amostragem automática de ar
Laboratório de Culturas Ativas	C	Amostragem automática de ar

### 6.2.3 Monitorização microbiológica das salas de Classe D:

Semanalmente, é efetuada a monitorização microbiológica em atividade nos laboratórios/salas com classe D, de acordo com as indicações da tabela 2.

**Tabela 2** – Monitorização de rotina nas salas/laboratórios de Classe D.

Área a monitorizar	Classe	Método de amostragem
Corredor acesso ao Laboratório de Culturas Inativas e de Formulação e Enchimento	D	Amostragem automática de ar
Laboratório de Culturas Inativas	D	Amostragem automática de ar
Sala de Distribuição de Meios Estéreis	D	Amostragem automática de ar
Sala de Pesagens e Preparação de Meios	D	Amostragem automática de ar
Corredor acesso às salas de apoio	D	Amostragem automática de ar
Laboratório de Controlo de Qualidade do Produto Acabado	D	Amostragem automática de ar
Laboratório de Microbiologia	D	Amostragem automática de ar

### 6.2.4 Monitorização microbiológica dos equipamentos:

- A monitorização microbiológica de equipamentos só se aplica àqueles em que os produtos intermédios ou finais ficam expostos, tais como CFL e TFL. Nesses equipamentos, como já foi referido, para além das placas de exposição faz-se ainda placas de contacto semanalmente, mudando-se o local a controlar de semana para semana.
- Mensalmente, nas estufas e frigoríficos onde se incubam e guardam placas contaminadas (microbiologia e laboratório culturas ativas), a monitorização microbiológica é feita através da incubação de placas de Agar Sangue e SDA, não inoculadas, expostas ao ambiente durante o tempo definido na tabela 3.

**Tabela 3-** Monitorização de rotina nos equipamentos com placas contaminadas.

Método de amostragem	Meio de Cultura	Equipamento	Tempo de 'exposição'	Incubação
Placa fechada não inoculada	Agar Sangue SDA	Estufas em funcionamento	Referido na incubação	Até 7 dias, a 37°C Até 7 dias, a 25°C
Placa fechada não inoculada	Agar Sangue SDA	Frigoríficos em funcionamento	Mínimo 48 horas	Até 7 dias, a 37°C Até 7 dias, a 25°C

Nos restantes equipamentos como agitadores orbitais, estufas do controlo de qualidade e restantes frigoríficos só se farão controlos microbiológicos se existir algum derrame, quebra de *shots*/frascos ou contaminações em processo que justifiquem esse controlo. Nessa altura é definido que tipo de controlo que melhor se adequa à situação e é devidamente registada no 'MOD 1308'.

### 6.3 Registo dos resultados

- Todos os resultados obtidos são registados no 'MOD 1312', sendo sempre indicada a data de amostragem.
- Caso no resultado se verifique crescimento microbiano, o operador regista o número de UFC existentes na placa de amostragem.

### 6.4 Avaliação dos resultados

- É feita uma análise de tendências do número de colónias detetadas na monitorização microbiológica efetuada ao ar e às superfícies.
- Os limites recomendados para contaminação microbiológica estão resumidos na tabela 4, de acordo com o definido no Anexo 1 das BPF.

**Tabela 4** – Limites recomendados para contaminação microbiológica.

Classificação	Amostragem Ar (UFC/m <sup>3</sup> )	Placas Exposição 90 mm (UFC/4 horas)	Placas Contacto 55 mm (UFC/placa)
A	0	0	0
B	10	5	5
C	100	50	25
D	200	100	50

### 6.5 Critérios de aceitação

O procedimento de limpeza 'BPL 130006' será considerado validado caso sejam cumpridas as especificações para a monitorização microbiológica em todas as amostragens realizadas e não seja detectado qualquer tipo de tendência de aumento do número de colónias no intervalo de tempo em que decorrer a validação.



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DE LIMPEZA

### 7. Relatório de validação

No final da validação é elaborado um relatório que inclui pelo menos o seguinte:

- Equipamentos e meios utilizados.
- Descrição dos parâmetros estudados.
- Resultados dos testes efetuados.
- Conclusões da validação do método.

### 8. Revalidação

A revalidação terá que ser efetuada caso se altere alguns dos parâmetros estabelecidos para a limpeza e desinfecção das salas e equipamentos.

# ANEXO 2



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE

### 1. Objetivo

Este protocolo descreve o modo de proceder de modo a validar o teste de esterilidade utilizado no controlo de qualidade das autovacinas e vacinas de rebanho.

### 2. Aplicação

Este protocolo aplica-se à validação do teste de esterilidade utilizado no controlo de qualidade do produto acabado (BPL 130015).

### 3. Definições

**Esterilidade:** Estado livre de microrganismos viáveis

**Microrganismos:** Seres vivos de dimensões microscópicas que existem como células únicas ou como grupos de células

**UFC:** Unidades formadoras de colónias

**TSB:** Meio *Tryptone Soy Broth*

### 4. Referências

Farmacopeia Europeia.

BPL 130015: Teste de Esterilidade.

MOD 1311: Resultados de Validação do Ensaio de Esterilidade.

### 5. Responsabilidades

O Responsável de Controlo de Qualidade é responsável por executar o descrito neste protocolo. A

Direção Técnica é responsável por elaborar o relatório final.

### 6. Modo operativo

- O ensaio de esterilidade das autovacinas e vacinas de rebanho é realizado pelo método de sementeira direta. O método carece de uma validação se o produto a testar contiver conservantes, ou seja, se possuir atividade antimicrobiana.
- A validação deve ser efetuada sempre que o teste de esterilidade é aplicado a um novo produto, sendo que os diferentes lotes de autovacina/vacina de rebanho produzidos só são considerados novos produtos se na formulação é utilizada uma concentração de solução de ~~timersal~~ diferente.
- O ensaio de validação deve ser realizado em condições de total assépsia, dentro de câmaras de fluxo laminar e utilizando sempre material estéril.



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE

### 6.1 Teste de promoção de crescimento

O teste de promoção do crescimento vai permitir determinar se o meio de cultura TSB utilizado no ensaio de esterilidade é adequado para o crescimento dos microrganismos apresentados na tabela 1. Este teste consiste em:

- Controlo negativo: incubar dois frascos de meio TSB, um a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para bactérias aeróbias e anaeróbias e outro a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para fungos e leveduras, durante pelo menos 14 dias.
- Teste de promoção de crescimento (controlo positivo): inocular um frasco de meio TSB com  $\leq 100$  UFC de cada um dos microrganismos indicados na tabela 1 e incubá-los conforme indicado.

Tabela 1. Microrganismos de referência para os ensaios de crescimento e validação.

Microrganismo	Meio	Incubação	
		Temperatura	Duração máxima
<b>Bactérias aeróbias</b>	TSB	$37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	3 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>			
<i>Bacillus subtilis</i>			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
<b>Bactérias anaeróbias</b>			
<i>Clostridium sporogenes</i>	TSB	$25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$	5 dias
<b>Leveduras e Fungos</b>			
<i>Candida albicans</i>			
<i>Aspergillus brasiliensis</i>			

#### 6.1.1 Avaliação dos resultados

Após o período de incubação os meios são avaliados visualmente para detectar a existência ou não de crescimento.

#### 6.1.2 Critério de aceitação

O teste é considerado satisfatório caso exista evidência clara de crescimento em todos os meios inoculados e ausência de crescimento nos meios não inoculados.

### 6.2 Sementeira direta

1. Semear diretamente o meio de cultura em duplicado com a quantidade de amostra indicada na tabela 2, de forma que o volume não ultrapasse os 10% do volume de meio.

Tabela 2: Quantidade de amostra a inocular nos ensaios de esterilidade.

Quantidade contida em cada recipiente	Quantidade mínima a inocular em cada meio de cultura
Inferior a 1 ml	O conteúdo total do recipiente
1 – 40 ml	Metade do conteúdo do recipiente mas não menos de 1 ml
> 40 -100 ml	20 ml
> 100 ml	10% do conteúdo do recipiente mas não menos de 20 ml



## PROTOCOLO DE VALIDAÇÃO DO TESTE DE ESTERILIDADE

2. Incubar os frascos de meios semeados durante, pelo menos, 14 dias, a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para bactérias aeróbias e anaeróbias e a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  para fungos e leveduras.
3. Repetir o teste de esterilidade tal como descrito no ponto 1., aplicando a seguinte alteração:
  - Inocular o meio, já com a amostra (vacina), com  $\leq 100$  UFC de cada um dos microrganismos apresentados na tabela 1. Incubar de acordo com o descrito em 2.
4. Efetuar em paralelo os testes de controlo positivo e negativo conforme descrito em 6.1.

Ou seja, em cada validação é necessário fazer:

A	B	C	D
Controlo negativo	Controlo positivo	Ensaio de validação	Esterilidade do produto
Incubar só meio	Incubar meio + estirpes	Incubar meio+ vacina + estirpes	Incubar meio+ vacina

### 6.3 Avaliação dos resultados

Após o período de incubação os meios são avaliados visualmente para detetar a existência ou não de crescimento.

### 6.4 Critérios de aceitação

- Se o crescimento microbiológico for semelhante nos controlos B e C, a atividade antimicrobiana da vacina nas condições do ensaio foi neutralizada.
- Se na presença da vacina o crescimento for inferior ou inexistente, esta ainda contém atividade antimicrobiana que não foi eliminada. Neste caso, as condições do ensaio deverão ser alteradas e o teste novamente validado.
- Se os crescimentos obtidos anteriormente estiverem de acordo com o descrito e não se verificar crescimento no controlo D significa que a vacina se encontra estéril.

## 7. Relatório de validação

No final da validação é elaborado um relatório que inclui pelo menos o seguinte:

- Identificação dos meios utilizados.
- Descrição dos parâmetros estudados.
- Resultados dos testes efetuados (MOD 1311).
- Conclusões da validação do método.

## 8. Revalidação

Sempre que sejam modificadas as condições experimentais do ensaio de esterilidade, terá de se proceder a uma revalidação.



# ANEXO 3



## PLANO SEMANAL DE CONTROLO AMBIENTAL

Data da amostragem/Início da incubação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Área a monitorizar	Amostra de ar (UFC/m <sup>3</sup> )*		PCA (UFC/Placa 55mm)
	TSA	SDA	
Antecâmara do laboratório de culturas ativas			-----
Laboratório de culturas ativas			-----
Camara de fluxo laminar do laboratório de culturas ativas	-----	-----	
Antecâmara do laboratório de formulação e enchimento			-----
Laboratório de formulação e enchimento			-----
Mesa da tenda do laboratório de formulação e enchimento	-----	-----	
Corredor de acesso ao laboratório de formulação e enchimento e de culturas inativas			-----
Laboratório de culturas inativas			-----
Camara de fluxo laminar do laboratório de culturas inativas	-----	-----	
Sala de pesagens e preparação de meios			-----
Sala de distribuição de meios estéreis			-----
Camara de fluxo laminar da sala de distribuição de meios estéreis	-----	-----	
Corredor de acesso às salas de apoio			-----
Laboratório controlo qualidade produto acabado			-----
Laboratório de microbiologia			-----
Camara de fluxo laminar do laboratório de microbiologia	-----	-----	

\* Como calcular um resultado (consultar tabela do aparelho - MAS100).

**EXEMPLO:** Volume de amostragem utilizado no MAS 100: 100 l  
 Número de colónias na placa de agar: 109 UFC  
 Nº de colónias corrigidas utilizando a tabela de **Eeller**: 127 UFC  
 Número de UFC/m<sup>3</sup> = 127 UFC x 1000 litros/100 litros = 1270 UFC/m<sup>3</sup>



# REGISTO SEMANAL DE CONTROLO AMBIENTAL

Área a monitorizar	Placas de exposição		Data
	TSA Placa 99 mm (UFC/4h)	TSA Placa 99 mm (UFC/4h)	
Câmara de fluxo laminar do laboratório de culturas ativas			
Câmara de fluxo laminar do laboratório de culturas inativas			
Tenda de fluxo laminar do laboratório de formulação e enchimento			
Câmara de fluxo laminar da sala de distribuição de meios estéreis			
Câmara de fluxo laminar do laboratório de microbiologia			

\_\_\_\_\_  
Operador

\_\_\_\_\_  
Data

# ANEXO 4



## RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ESTERILIDADE

Em cada validação é necessário fazer:

A	B	C	D
Controlo negativo	Controlo positivo	Ensaio de validação	Esterilidade do produto
Incubar só meio	Incubar meio + estirpes	Incubar meio+ vacina + estirpes	Incubar meio+ vacina

Estirpes a testar no ensaio:

Microorganismo	Meio	Incubação	
Bactérias aeróbias		Temperatura	Duração máxima
<i>Staphylococcus aureus</i> (Sa) <i>Bacillus subtilis</i> (Bs) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa)	Tryptone Soy Broth (TSB)	37±2°C	3 dias
Bactérias anaeróbias			
<i>Clostridium sporogenes</i> (Cs)			
Leveduras e Fungos			
<i>Candida albicans</i> (Ca) <i>Aspergillus brasiliensis</i> (Ab)	Tryptone Soy Broth (TSB)	25±2°C	5 dias

Identificação dos meios usados:

Designação: \_\_\_\_\_ Lote: \_\_\_\_\_ Validade: \_\_\_\_\_

Identificação das estirpes usadas:

*Staphylococcus aureus* (Sa): \_\_\_\_\_

*Bacillus subtilis* (Bs): \_\_\_\_\_

*Pseudomonas aeruginosa* (Pa): \_\_\_\_\_

*Clostridium sporogenes* (Cs): \_\_\_\_\_

*Candida albicans* (Ca): \_\_\_\_\_

*Aspergillus brasiliensis* (Ab): \_\_\_\_\_

Identificação dos equipamentos usados:

Estufa a 37°C: \_\_\_\_\_

Estufa a 25°C: \_\_\_\_\_



## RESULTADOS DA VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ESTERILIDADE

Tabela de resultados da Validação do Ensaio de Esterilidade:

Controlos	Incubações	Observação de Crescimento (por turvação)
<b>A</b>	TSB a 37°C± 2°C	
	TSB a 25°C± 2°C	
<b>B</b>	TSB + <b>Sa</b> a 37°C±2°C	
	TSB + <b>Bs</b> a 37°C±2°C	
	TSB + <b>Pa</b> a 37°C±2°C	
	TSB + <b>Cs</b> a 37°C±2°C	
	TSB + <b>Ca</b> a 25°C±2°C	
	TSB + <b>Ab</b> a 25°C±2°C	
<b>C</b>	TSB + vacina + <b>Sa</b> a 37°C±2°C	
	TSB + vacina + <b>Bs</b> a 37°C±2°C	
	TSB + vacina + <b>Pa</b> a 37°C±2°C	
	TSB + vacina + <b>Cs</b> a 37°C±2°C	
	TSB + vacina + <b>Ca</b> a 25°C±2°C	
	TSB + vacina + <b>Ab</b> a 25°C±2	
<b>D</b>	TSB + vacina a 37°C±2°C	
	TSB + vacina a 25°C±2°C	